

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
KAREN FRANCINE KÖHLER

**PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO: AVALIAÇÃO CELULAR E HUMORAL DE
EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 E SUA
RELAÇÃO COM OS GENÓTIPOS *HLA-DRB1* ASSOCIADOS À DOENÇA.**

CURITIBA
2009

KAREN FRANCINE KÖHLER

**PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO: AVALIAÇÃO CELULAR E HUMORAL DE
EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 E SUA
RELAÇÃO COM OS GENÓTIPOS *HLA-DRB1* ASSOCIADOS À DOENÇA.**

**Tese apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor
em Genética, curso de Pós-Graduação
em Genética, Universidade Federal do
Paraná.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza
Petzl-Erler (UFPR)**

**Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luiza
Guilherme Guglielmi
(InCor-FMUSP)**

CURITIBA

2009



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



PARECER

Os abaixo-assinados, Membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado a que se submeteu **KAREN FRANCINE KÖHLER**, para fins de obter o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 26 de Maio de 2009.

Banca Examinadora:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler - UFPR
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Profª Drª Anna Carla Goldberg - Instituto Alberto Einstein, SP
Membro Titular

Profª Drª Iara J. T. de Messias Reason - Depto. Patologia Básica, UFPR
Membro Titular

Profª Drª Angelica Beate Winter Boldt - Depto. Patologia Básica, UFPR
Membro Titular

Profª Drª Nina Amália Brancina Pagnan - Depto. Genética, UFPR
Membro Titular

Visto: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Centro Politécnico - Caixa Postal 19071 - CEP: 81531-980 - Curitiba, PR
Telefones: (41) 3361-1587 - Fax (41) 3361-1793 - ppg-gen@ufpr.br
www.genetica.ufpr.br/posgraduacao

AGRADECIMENTOS

Esta tese representa a concretização de um esforço interdisciplinar, contando com a cooperação efetiva de diversas instituições, profissionais, amigos e familiares, aos quais sou imensamente grata.

À Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, (Departamento de Genética - UFPR), pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho de doutorado sob sua orientação, pelo apoio, compreensão nas horas difíceis e pela amizade construída ao longo de mais de uma década de convivência. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Luiza Guglielmi (InCor/FMUSP), pela acolhida no grupo de pesquisa de Febre Reumática e por me dar a oportunidade de realização do trabalho de doutorado em seu laboratório. Pela amizade e apoio nas horas difíceis, e também pelo tempo dedicado à correção deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Mari Cleide Sogayar (Departamento de Bioquímica – IQ/USP), por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse aprender sobre biologia molecular. Obrigada pela confiança e por ter me ajudado na expressão da proteína recombinante da desmogleína 1.

À minha querida amiga Sandra Emiko, a quem devo tudo que sei sobre cultura de células. San, serei eternamente grata por tudo que você me ensinou, pela paciência com a qual você me orientou diariamente em meu trabalho, mas principalmente pela sua amizade sincera. Você foi minha primeira amiga em São Paulo, que acompanhou o meu dia-a-dia, torceu por mim e me ajudou a superar todos os problemas pelos quais passei até a conclusão desse trabalho.

À minha amiga Selma, outra grande pessoa que me ajudou muito durante o doutorado. Muito obrigada por ter me ensinado as técnicas de extração de RNA e RT-PCR, com muita calma e profissionalismo. Obrigada também por sua companhia nos momentos de descontração.

À Sandra Maria, pela amizade e por ter me ensinado a técnica de citometria de fluxo, durante o seu super descontraído curso e também naquelas horas que o aparelho insistia em não compensar os parâmetros.

À Simone Regina, que além de minha amiga, foi executora dos ensaios de ELISA, que vieram a ser essências para o término desse trabalho. Muito obrigada.

À minha amiga querida Nathi, por ter me orientado durante as PCRs para o

RCT e também pela solicitude, doando sangue para que eu pudesse realizar os ensaios de proliferação antígeno-específico. Amiga, não sei o que seria de mim sem o seu HLA-DR. Muito obrigada!

À Flávia, Iolanda e Carolina Lavine, que também muitas vezes doaram sangue para que eu pudesse realizar meus experimentos de apresentação antígeno-específico. Obrigada mesmo!

A todos os outros doadores de *feeder* ao longo da execução desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Cláudio e Washington, pela síntese de todos os peptídeos e pela torcida diária para que tudo desse certo.

Ao pessoal do grupo de FR, pela acolhida e ajuda a qualquer hora.

A todos do Laboratório de Imunologia (InCor), pela amizade, discussões científicas e apoio em todas as horas.

Ao Ricardo Correa e Antero Macedo, pela ajuda no início do trabalho de expressão da proteína recombinante.

Ao Marcos, meu professor de biologia molecular. Consegui expressar a proteína graças a sua orientação diária. Muito obrigada por toda a ajuda nessa etapa do projeto e também pela correção da tese.

A todos dos laboratórios de Biologia Celular e Molecular e Unidade de Ilhotas Pancreáticas (IQ/USP), pela acolhida e momentos descontraídos no laboratório.

À Noemi, Hécio e Malu, pelas tipificações HLA-DR dos pacientes.

À minha amiga e companheira de doutorado, Danielle Malheiros. A nossa amizade foi essencial na superação de todos os momentos de dificuldades que passamos durante o doutorado. Obrigada também pelo envio das amostras de pacientes!

À minha querida amiga Márcia Beltrame, que inúmeras vezes solucionou problemas “burocráticos” para mim durante o doutorado. Perdi a conta de quantas vezes você foi ao correio por conta disso. Obrigada por tudo amiga, pela amizade, pelo apoio e pelas conversas via MSN.

A todos do LGMH (UFPR), que me ajudaram nos problemas de “logística”, com a compra, recebimento e envio de materiais.

Ao meu irmão Cristiano, você é o irmão com mil e uma habilidades que todo mundo queria ter! Obrigada pela edição de figuras e formatação da tese!

Ao Leandro, a mais agradável surpresa que a vida paulistana me reservou. Obrigada pelo apoio, amor, dedicação e compreensão nos momentos difíceis, ao longo de todos esses anos de doutorado.

À Ana Lúcia, minha amiga e *roommate*. Pela amizade e por trazer a calma e a tranquilidade mineira ao meu dia a dia.

A todos pacientes e familiares, e demais colaboradores, que participaram deste estudo de forma desinteressada e solidária, através da doação das amostras de sangue e biópsias, o meu respeito e agradecimento.

À Dra. Ana Roselino e sua equipe de médicos residentes e enfermeiros, por todo auxílio durante a coleta das amostras no HC-FMRP/USP.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética e à sua coordenação, que possibilitaram a realização deste trabalho de tese de doutorado.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao CNPq e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro ao projeto de doutorado.

"Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades, devemos nos lembrar que o carvalho cresce forte através de ventos contrários e que os diamantes são formados sob pressão."

--Peter Marshall

Dedico esta tese aos meus pais e meu irmão, pelo apoio e incentivo durante toda a minha formação, sempre superando as dificuldades impostas pela distância para me alimentar de energia e força necessárias a conclusão de mais essa etapa.

RESUMO

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune órgão-específica, caracterizada pela presença de autoanticorpos IgG, predominantemente da subclasse IgG4, contra ectodomínios da proteína desmogleína 1 (DSG1), levando ao processo de acantólise. A doença é desencadeada pela exposição a fatores ambientais, que nas áreas endêmicas possivelmente são insetos hematófagos, especialmente *Simulium nigrinatum*. Há uma maior susceptibilidade ao PFE nos indivíduos que apresentam os alelos *HLA-DRB1* pertencente aos grupos *01 e *04 e menor em indivíduos cujos genótipos incluem alelos dos grupos *07, *08 e *11, bem como o alelo *0301. O mimetismo antigênico é o possível mecanismo desencadeador da doença, iniciada por estímulos ambientais, levando a geração de autoanticorpos não patogênicos contra o quinto ectodomínio extracelular da DSG1 (EC5). Em indivíduos geneticamente predispostos ocorre a geração de autoanticorpos patogênicos contra o primeiro (EC1) e segundo (EC2) ectodomínios da DSG1, através do espalhamento intramolecular de epítomos. O presente trabalho teve por objetivo realizar um mapeamento de epítomos imunodominantes da proteína desmogleína 1 e correlacionar o perfil das respostas celular e humoral da proteína DSG1 e peptídeos sintéticos em pacientes e indivíduos saudáveis com os genótipos *HLA-DRB1* associados à susceptibilidade ou resistência ao PF. Estudos anteriores mostraram que linhagens celulares e clones de LT CD4⁺ derivados do sangue periférico de pacientes com pênfigo foliáceo possuem resposta proliferativa aos ectodomínios da proteína recombinante da desmogleína 1. Essa resposta é restrita à apresentação de peptídeos por moléculas HLA-DR e promove a secreção de citocinas do tipo Th2 que estimulam a produção de autoanticorpos por LB autorreativos. Porém, até o presente momento nenhum peptídeo da DSG1 reconhecido por essas células T havia sido identificado. Através desse estudo identificamos epítomos imunodominantes da proteína DSG1, tanto da fase pré-clínica quanto clínica da doença. O reconhecimento celular e humoral preferencial de peptídeos por pacientes ou indivíduos saudáveis está associado aos genótipos *HLA-DRB1* de susceptibilidade ao PF. Os peptídeos EC5 (524-540) e EC5 (530-549), mais frequentemente reconhecidos por indivíduos saudáveis e também presentes em pacientes não tratados e em tratamento, compartilham uma sequência de aminoácidos que pode ser parte de um epítomo imunodominante reconhecido por autoanticorpos do EC5 durante a reação cruzada originada por mimetismo molecular com o agente ambiental. O peptídeo EC2 (235-258), reconhecido preferencialmente por anticorpos e células T de pacientes não-tratados, é um epítomo imunodominante, possivelmente alvo de reconhecimento por LT CD4⁺ durante o espalhamento intramolecular de epítomos em PF. Observamos também que pacientes em tratamento, durante a fase de remissão da doença mantêm LT CD4⁺ de memória para esse epítomo, porém apresentam resposta humoral preferencial a um terceiro epítomo de EC5, resíduos 499 a 518. Dessa forma postula-se que os autoanticorpos não patogênicos gerados durante a fase de remissão clínica do PF são direcionados a um novo epítomo do EC5 não reconhecido preferencialmente por indivíduos saudáveis. Estudos mais aprofundados do papel dessas sequências imunodominantes poderão contribuir para o desenvolvimento de novas imunoterapias visando à indução de tolerância em indivíduos geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento do PF.

ABSTRACT

Pemphigus foliaceus is an epidermal autoimmune disease, characterized by presence of IgG antibodies, predominantly of the IgG4 subclass, against desmoglein 1 (DSG1) protein ectodomains. Acantholysis is the hallmark of the disease, which clinically is characterized by superficial blisters. Also known as *fogo selvagem* (meaning wild fire), pemphigus foliaceus is endemic in certain regions of Brazil. Genetic and environmental factors generate and modulate the autoimmune response. The disease is triggered by exposure to one or several possible environmental factors, that in endemic areas probably are hematophagous insects, especially *Simulium nigrinatum*. Susceptibility to endemic pemphigus foliaceus is higher among individuals that carry *HLA-DRB1* alleles belonging to lineages *01 and *04 (susceptible alleles) and lower for individuals whose genotypes include alleles of lineages *07, *08 and *11, as well as allele *0301 (protective alleles). Antigenic mimicry with a viral or salivary protein transmitted by the insect possibly leads to the production of non-pathogenic autoantibodies against the fifth ectodomain (EC5) of DSG1. In those genetically predisposed individuals, pathogenic autoantibodies against the first (EC1) and second (EC2) ectodomains of DSG1 are generated through intramolecular epitope spreading. The aim of present study was to map the immunodominant epitopes of the DSG1 protein and to verify if the profile of humoral and cellular immune responses to the autoantigen and synthetic peptides correlate with *HLA-DRB1* genotypes associated to increased susceptibility or resistance to the disease. Previous studies showed that CD4⁺ lymphocyte T lineages and clones derived of peripheral blood of patients with pemphigus foliaceus proliferate in response to ectodomains of recombinant DSG1. This response was restricted to presentation of peptides by HLA-DR molecules and led to secretion of Th2 cytokines that stimulate the production of antibodies by autoreactive B lymphocytes. However, the epitopes recognized by these cells had thus far not been identified. In the present study, we identified immunodominant epitopes of pre-clinic and clinic phases. The peptides preferentially recognized during cellular and humoral responses by patients and healthy individuals seemingly differ according to the *HLA-DRB1* genotypes related to higher or lower susceptibility to pemphigus foliaceus. The peptides EC5(524-530) and EC5(530-549), most frequently recognized by healthy individuals and also by patients in treatment and without therapy, share an aminoacid sequence that can be part of an immunodominant epitope recognized by EC5 autoantibodies during the initial response, possibly raised by molecular mimicry with the environmental antigen. The peptide EC2(235-258), preferentially recognized by autoantibodies and T cells of patients without therapy, is an immunodominant epitope, possibly target of CD4⁺ T lymphocytes during the intramolecular epitope spreading phase leading to overt disease. In addition, we observed that treated patients kept memory CD4⁺ T lymphocytes to this peptide during the remission phase of disease, but developed humoral response to a third peptide in the EC5 ectodomain, spanning from residues 499 to 518. This observation revealed that the non-pathogenic autoantibodies generated during the remission phase are driving to an epitope of EC5 not preferentially recognized by healthy individuals. Additional studies dissecting the role of these immunodominant peptides can contribute to development of new immunotherapies aiming to induce tolerance in genetically susceptible individuals, thus avoiding the development of pemphigus foliaceus.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS PÊNFIGOS	26
TABELA 2 – MOTIVOS DE PEPTÍDEOS QUE SE LIGAM ÀS MOLÉCULAS HLA-DR ASSOCIADAS A PV E PF	40
TABELA 3 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA OBTENÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DA DSG1 PARA CLONAGEM NO VETOR PLPCX	57
TABELA 4 – PROTOCOLO UTILIZADO NA DIGESTÃO DO VETOR E INSERTO COM AS ENZIMAS BamH I e Hind III (rDSG1) e Bgl II e Hind III (pLPCX)	58
TABELA 5 – PROTOCOLO UTILIZADO NA LIGAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DA DSG1 AO PLASMÍDIO PLPCX	59
TABELA 6 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	60
TABELA 7 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICADORA DA DSG1 CLONADA NO VETOR PLPCX	60
TABELA 8 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA: PM TEÓRICO E OBTIDO	72
TABELA 9 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES ENVOLVIDOS NO ESTUDO.	74
TABELA 10 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA HPRT	82
TABELA 11 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS VB DO RCT	83
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS	103
TABELA 13 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS GENERALIZADA OU LOCALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS	108
TABELA 14 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS	115
TABELA 15 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS GENERALIZADA OU LOCALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS	117
TABELA 16 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS E CLONES DE LT DE CMSP OBTIDOS	119
TABELA 16 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS E CLONES DE LT DE CMSP OBTIDOS (CONTINUAÇÃO)	120
TABELA 17 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS E CLONES DE LT INTRALESIONAIS	123

TABELA 18 – RESUMO DA REATIVIDADE AO PEPTÍDEO IMUNODOMINANTE EC2 (235-258)	133
TABELA 19 – INTERAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE ALELOS HLA-DRB1 ASSOCIADOS AO PF	134
TABELA 20 – CLASSIFICAÇÃO DOS ALELOS ASSOCIADOS À SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF DE ACORDO COM O CRITÉRIO 3 DE Pavoni e cols. (2003).....	135

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DE PF	31
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO DESMOSSOMO	34
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA DSG1	35
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO ESQUEMÁTICA DOS LOCI GÊNICOS DO SISTEMA HLA.....	37
FIGURA 5 – MODELO PARA A VIA IMUNOPATOGENICA DE PF.....	51
FIGURA 6 – ESQUEMA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA INSERÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO E HIS-TAG NO CDNA DE DSG1	57
FIGURA 7 – ESQUEMA DE LIGAÇÃO ENTRE DSG1 E O VETOR pLPCX	59
FIGURA 8 – LIGAÇÃO QUÍMICA ENTRE NI-NTA E 6xHIS.....	67
FIGURA 9 – PERFIL DE HPLC DO PEPTÍDEO EC2 (235-258) PURIFICADO	70
FIGURA 10 – PERFIL DE ESPECTRO DE MASSA DO PEPTÍDEO EC2 (235-258)	70
FIGURA 11 – PEPTÍDEOS DA REGIÃO EC1 DE DSG1	71
FIGURA 12 – PEPTÍDEOS DA REGIÃO EC2 DE DSG1	71
FIGURA 13 – PEPTÍDEOS DA REGIÃO EC5 DE DSG1	71
FIGURA 14 – FOTOGRAFIA DO CULTIVO DE LINFÓCITOS PROVINIENTES DA BIÓPSIA DE PELE	79
FIGURA 15 – SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDIO pLPCX-DSG1	89
FIGURA 16 – WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DE pLPCX-DSG1 EM 293T	91
FIGURA 17 – EXPRESSÃO DE EGFP APÓS SELEÇÃO COM PUROMICINA	93
FIGURA 18 – PURIFICAÇÃO DA rDSG1	94
FIGURA 19 – PURIFICAÇÃO DA rDSG1 (continuação).....	94
FIGURA 20 – WESTERN BLOT DA rDSG1 PURIFICADA	95
FIGURA 21 – REATIVIDADE HUMORAL GLOBAL À rDSG1 EM PACIENTES NÃO TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS.....	96
FIGURA 22 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA A rDSG1 DE PACIENTES NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS	97
FIGURA 23 – REATIVIDADE HUMORAL À rDSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS	97
FIGURA 24 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA A rDSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS.....	98
FIGURA 25 – REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS	100
FIGURA 26 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 DE PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E CONTROLES SADIOS ...	101
FIGURA 26 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS	

	ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 DE PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E CONTROLES SADIOS (CONTINUAÇÃO)	102
FIGURA 27 –	RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL (DO) AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS E EM TRATAMENTO	104
FIGURA 28 –	RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL (DO) AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM INDIVÍDUOS SADIOS	105
FIGURA 29 –	MAPEAMENTO DA REATIVIDADE DE PACIENTES ANTES E PÓS- TRATAMENTO E DE INDIVÍDUOS SADIOS (CONTROLES)	106
FIGURA 30 –	RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL (DO) AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF	109
FIGURA 31 –	FREQÜÊNCIA DE RECONHECIMENTO DA rDSG1 POR PACIENTES NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS.....	111
FIGURA 32 –	REATIVIDADE CELULAR INDIVIDUAL À rDSG1 EM PACIENTES NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E CONTROLES SADIOS ...	111
FIGURA 33 –	FREQÜÊNCIA DE RECONHECIMENTO DA rDSG1 POR PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS	112
FIGURA 34 –	REATIVIDADE CELULAR INDIVIDUAL À rDSG1 1 EM PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS	112
FIGURA 35 –	REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS	114
FIGURA 36 –	REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM PACIENTES COM AS FORMAS GENERALIZADA OU LOCALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS	116
FIGURA 37 –	RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR (IE) À rDSG1 E PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM LINHAGENS E.....	121
FIGURA 38 –	RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR (IE) À rDSG1 E PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM LINHAGENS E.....	124
FIGURA 39 –	PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS.....	128
FIGURA 40 –	PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES PF EM TRATAMENTO	129
FIGURA 41 –	PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA DE PF	130
FIGURA 42 –	PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DE PF	131

FIGURA 43 – PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM INDIVÍDUOS SADIOS	132
FIGURA 44 – FREQUÊNCIA DE ALELOS HLA-DR NA AMOSTRA DE PACIENTES COM PF ESTUDADA	135
FIGURA 45 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL PARA A rDSG1 EM PACIENTES PF AGRUPADOS DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF	136
FIGURA 46 – REATIVIDADE CELULAR INDIVIDUAL PARA A rDSG1 EM PACIENTES PF AGRUPADOS DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA A PF	137
FIGURA 47 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM INDIVÍDUOS SADIOS AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF	139
FIGURA 48 – RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR À PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM INDIVÍDUOS SADOS, AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF	140
FIGURA 49 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF, AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF	141
FIGURA 50 – RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF, AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF	142

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	– micrograma
µl	– microlitro
293T	– linhagem celular 293T
Amp^r	– gene de resistência à ampicilina
APC	– célula apresentadora de antígeno
AR	– artrite reumatóide
BSA	– albumina bovina sérica
Ca²⁺	– íon cálcio
CD25⁺	– marcador de LT regulador; grupo de diferenciação 25 (<i>Cluster of Differentiation 25</i>)
CD4⁺	– marcador de LT auxiliar; grupo de diferenciação 4 (<i>Cluster of Differentiation 4</i>)
CD8⁺	– marcador de LT citotóxico; grupo de diferenciação 8 (<i>Cluster of Differentiation 8</i>)
CD80	– proteína CD80, grupo de diferenciação 80 (<i>Cluster of Differentiation 80</i>)
CD86	– proteína CD86, grupo de diferenciação 86 (<i>Cluster of Differentiation 86</i>)
cDNA	– ácido desoxirribonucleico complementar
CDR	– região determinante de complementariedade
cm	– centímetro
CMSP	– células mononucleares de sangue periférico
CN	– controle negativo
CO₂	– dióxido de carbono
CP	– controle positivo
CPH	– complexo principal de histocompatibilidade
cpm	– contagem por minuto
CTLA-4	– antígeno 4 do linfócito T citotóxico (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
Cβ	– região constante da cadeia beta das imunoglobulinas
DEPC	– dietilpirocarbonato
DMEM	– meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	– ácido desoxirribonucleico
dNTP	– desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO – densidade ótica

dsDNA – ácido desoxirribonucleico dupla fita

DSG1 – desmogleína 1

DSG3 – desmogleína 3

EC1 – primeiro domínio extracelular da proteína desmogleína 1

EC2 – segundo domínio extracelular da proteína desmogleína 1

EC3 – terceiro domínio extracelular da proteína desmogleína 1

EC4 – quarto domínio extracelular da proteína desmogleína 1

EC5 – quinto domínio extracelular da proteína desmogleína 1

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EGFP – proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

ELISA – ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

env – gene que codifica proteínas do envelope viral

FACS – *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

Fmoc – estratégia Fmoc (9- fluorenil-metoxycarbonila) para síntese de peptídeos

Foxp-3 – *forkhead box P3*

FR – febre reumática

FS – fogo selvagem

gag – gene que codifica uma poliproteína para funcionamento do cerne retroviral

GITR – fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóides (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*)

H⁺ – íon hidrogênio

H₂O – água

H₂PO₄ – fosfato

HBTU – hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HEK – célula de rim humano embrionário (*kidney embryonic cell*)

HLA – antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen*)

HOBt – 1-hidroxibenzotriazol

HPLC – cromatografia líquida de alta afinidade (*High-performance liquid chromatography*)

HPRT – Hipoxantina Fosforibosil Transferase (hypoxanthina phosphoribosyl transferase),

HRP	– peroxidase de raiz forte (<i>horseradish peroxidase</i>)
IE	– índice de estimulação
IFI	– imunofluorescência indireta
IFN-γ	– interferon gama
IgG	– imunoglobulina G
IgM	– imunoglobulina M
IL-10	– interleucina 10
IL-12	– interleucina 12
IL-2	– interleucina 2
IL-4	– interleucina 4
IL-5	– interleucina 5
IL-6	– interleucina 6
KCl	– cloreto de potássio
kDa	– quilodalton
kg	– quilograma
LB	– linfócito B
LB	– meio de cultura de bactérias – <i>Luria Broth Base</i>
LES	– lúpus eritematoso sistêmico
LT	– linfócito T
mg	– miligrama
MgCl₂	– cloreto de magnésio
mm	– milímetro
MOMuLV	– vírus da leucemia murina de Moloney (<i>Moloney Murine Leukemia Vírus</i>)
MOMuSV	– vírus do sarcoma murino de Moloney (<i>Moloney Murine Sarcoma Vírus</i>)
mRNA	– ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	– cloreto de sódio
NE	– alelo <i>HLA-DRB1</i> neutro ao pênfigo foliáceo
NH₂	– radical amino
Ni²⁺	– íon níquel
nm	– nanômetro
NTA	– ácido nitriloacético

oligo(dT)	– oligonucleotídeo iniciador complementar a cauda poli A do mRNA
PBS	– tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBSA	– tampão fosfato-salino com azida (<i>Phosphate buffered saline with azide</i>)
PCR-SSOP	– reação em cadeia da polimerase – oligonucleotídeo sonda sequência específico
PF	– pênfigo foliáceo
PFE	– pênfigo foliáceo endêmico
PHA	– fitohemaglutinina
pKSII	– vetor de clonagem <i>Bluescript</i>
pLPCX	– vetor retroviral de expressão de proteínas em células de mamíferos
PM	– peso molecular
<i>pol</i>	– gene que codifica a transcriptase reversa
PRO	– alelo <i>HLA-DRB1</i> de proteção ao pênfigo foliáceo
Puro^r	– gene de resistência à puomicina
PV	– pênfigo vulgar
Rad	– dose de radiação absorvida (<i>radiation absorbed dose</i>)
Rag 2	– gene ativador da recombinase 2 (<i>recombinase activating gene</i>)
RCT	– receptor de célula T
rDSG1	– proteína recombinante da DSG1
RIPA⁺	– tampão de precipitação de proteínas para radioimunoensaios
RPM	– rotações por minuto
RPMI	– meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
RR	– risco relativo
RT-PCR	– transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase
SDS	– sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	– sódio dodecil sulfato – eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	– soro fetal bovino
SHN_i	– soro humano normal inativado
SPD	– dermatose pustulosa sub-cutânea
SU	– alelo <i>HLA-DRB1</i> de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo
TA	– temperatura ambiente
TBS	– tampão Tris-salino (<i>Tris buffered saline</i>)

TEM	– intra-epidérmico neutrofílico
TGF-β	– fator de necrose tumoral beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th1	– linfócito T CD4 ⁺ T <i>helper</i> 1
Th2	– linfócito T CD4 ⁺ T <i>helper</i> 2
Th3	– linfócito T CD4 ⁺ T <i>helper</i> 3
Thy	– timidina triciada
Treg	– célula T reguladora
V	– volts
V_H	– segmento de variabilidade da cadeia pesada das imunoglobulinas ou RCT
Vβ	– região variável da cadeia beta das imunoglobulinas
θNX	– linhagem celular <i>Phoenix</i>
Ψ⁺	– sinal de empacotamento do transcrito retroviral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO.....	25
2.2.1 Histórico e aspectos epidemiológicos.....	25
2.2.2 Quadro Clínico, classificação, diagnóstico e tratamento	29
2.2.3 Etiologia.....	30
2.2.4 O auto-antígeno desmogleína 1	33
2.2.5 Estudos de associação entre genes HLA e PF	36
2.2.6 Resposta Humoral em PF	41
2.2.7 Resposta Celular em PF	44
2.2.8 Possíveis mecanismos de patogênese do PF	47
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DA DESMOGLEÍNA 1 (DSG1)	53
4.1.1 Obtenção do cDNA	53
4.1.2 Transformação por choque térmico e extração dos plasmídios pKSII p536 e p812	54
4.1.3 Extração do DNA plasmidial em média escala.....	54
4.1.4 Clonagem da região codificadora de Dsg1 no vetor de expressão pLPCX.....	55
4.1.4.1 Obtenção da região codificadora da porção extracelular da Dsg1 para clonagem no vetor pLPCX	55
4.1.4.2 Digestão e purificação do vetor pLPCX e da seqüência amplificada por PCR da região codificadora da porção extracelular da Dsg1	58
4.1.4.3 Ligação do vetor pLPCX e da seqüência da região codificadora da porção extracelular da Dsg1	59
4.1.5 Seqüenciamento dos clones	60
4.1.6 Transfecção celular transitória	61
4.1.7 Coleta do meio de cultura e extração de proteínas celulares.....	62
4.1.8 Western blot	62
4.1.9 Produção retroviral de pLPCX-Dsg1 em linhagem celular Phoenix amphi.....	64
4.1.10 Transdução do sobrenadante viral em 293T	65
4.1.11 Seleção das células 293T transduzidas	66
4.1.12 Cultura de populações estáveis expressando rDsg1 e coleta de sobrenadante	66
4.1.13 Purificação da desmogleína 1 recombinante (rDsg1).....	66
4.1.14 Quantificação da rDsg1 purificada	68
4.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA DSG1.....	69
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E BIÓPSIAS DE PELE	72
4.4 PROCESSAMENTO DO SANGUE PERIFÉRICO	73
4.4.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	73
4.4.2 Congelamento e descongelamento celular	75

4.5 TIPIFICAÇÃO DO GENE <i>HLA-DRB1</i>	76
4.6 IDENTIFICAÇÃO DA SUBPOPLAÇÃO DE LINFÓCITOS T POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)	77
4.7 OBTENÇÃO DE LINHAGEM DE LINFÓCITOS T	77
4.7.1 Linhagens de CMSP	77
4.7.2 Linhagens de linfócitos T intralesionais	78
4.8 CLONAGEM DE LINFÓCITOS T	78
4.9 CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR DE CÉLULAS T (RCT) DE CLONES DE LINFÓCITOS T	79
4.9.1 Extração de RNA	79
4.9.2 Transcrição reversa para cDNA	80
4.9.3 Caracterização do RCT via PCR-V β C β	81
4.10 ENSAIOS CELULARES	84
4.10.1 Determinação da concentração ótima de proteína recombinante e peptídeo para a análise de resposta celular	84
4.10.2 Ensaio de proliferação antígeno-específica	85
4.11 ESTUDO DA RESPOSTA HUMORAL PELO MÉTODO DE ELISA	85
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
4.12.1 Resposta Celular	87
4.12.2 Resposta Humoral	87
5 RESULTADOS	88
5.1 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DA DESMOGLEÍNA 1 (RDSG1)	88
5.2 RESPOSTA HUMORAL À PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 RECOMBINANTE (rDSG1)	95
5.3 RESPOSTA HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SÍNÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1	98
5.4 RESPOSTA CELULAR À PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 RECOMBINANTE (rDsg1) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	110
5.5 RESPOSTA CELULAR AOS PEPTÍDEOS SÍNÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 ..	113
5.6 RESPOSTA CELULAR À rDSG1 E AOS PEPTÍDEOS SÍNÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM LINHAGENS E CLONES DE CMSP	118
5.7 RESPOSTA CELULAR À rDSG1 E AOS PEPTÍDEOS SÍNÉTICOS DOS PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM LINHAGENS E CLONES DE BIÓPSIA DE PELE	122
5.8 ANÁLISE CONJUNTA DA REATIVIDADE HUMORAL E CELULAR NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS	125
5.9 CORRELAÇÃO ENTRE REATIVIDADE HUMORAL E CELULAR E GENÓTIPOS HLA-DRB1 ASSOCIADOS A PF	134
6 DISCUSSÃO	143
7 CONCLUSÕES	157
REFERÊNCIAS	158

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO.....	170
ANEXO 2 – FICHA DE AVERIGUAÇÃO.....	171
ANEXO 3 – LISTA DE MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	176
ANEXO 4 – CÓDIGO (ABREVIATURA) - NOME COMPLETO DOS AMINOÁCIDOS.....	179

1 INTRODUÇÃO

A regulação da resposta imune a antígenos próprios é um processo complexo que envolve a manutenção de tolerância ao próprio e a preservação da capacidade de promover uma resposta imune efetiva contra patógenos.

A tolerância imunológica a antígenos próprios é um estado fisiológico, adquirido ao longo do desenvolvimento do sistema imune do organismo. Tanto o repertório de células T como o repertório de células B são selecionados, para que os linfócitos adquiram tolerância central e periférica a auto-antígenos.

A deleção por apoptose promove a seleção negativa de clones de linfócitos T e B autorreativos nos órgãos linfóides primários, sendo o principal mecanismo de tolerância do sistema imune ao próprio. Este processo é influenciado por diversos fatores: (i) grau de afinidade entre o antígeno-próprio e o receptor de células T e B; (ii) concentração e natureza do antígeno reconhecido; (iii) interação de co-receptores e de moléculas de adesão.

Entretanto, linfócitos potencialmente autorreativos patogênicos estão normalmente presentes na periferia de todos os indivíduos, sugerindo que haja mecanismos de tolerância periférica que previnam o desencadeamento de doenças autoimunes através da supressão dessas células (BALLOTTI e cols., 2006b).

Vários eventos estão envolvidos na manutenção de tolerância periférica: (i) deleção por seleção tímica; (ii) supressão/anergia clonal mediada por populações de células T reguladoras (Treg); (iii) diferentes estágios de maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs) incluindo células dendríticas (DCs); (iv) imunossupressão por citocinas, que modulam a direção da resposta imune, influenciando o micro-ambiente local (BALLOTTI e cols., 2006a; BALLOTTI e cols., 2006b).

Por outro lado, existe certo grau de autoimunidade fisiológica ou basal em indivíduos saudáveis. Seu nível pode variar na dependência de sobrecargas às quais o sistema imunológico esteja exposto. A autoimunidade fisiológica tem dois papéis principais no sistema imune: (i) modulação de respostas imunes em geral, ativando ou inibindo o reconhecimento de outros antígenos; (ii) participação específica da manutenção tecidual, rejeição a tecidos estranhos, proteção contra células tumorais e intensificação da resposta imune contra agentes infecciosos (COHEN, 2000).

As doenças autoimunes surgem da desregulação da autoimunidade fisiológica, que é ativada quando há necessidade de manutenção do organismo. A persistência da resposta imune e da destruição tecidual leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes, marcadas por um padrão de reações que levam ao dano do organismo. As doenças autoimunes são influenciadas por predisposição genética, respostas imunes a agentes infecciosos, susceptibilidade tecidual, fatores ambientais, gênero, idade, dieta alimentar, entre outros (COHEN, 2000).

Aproximadamente 5-7% da população mundial sofre de doenças autoimunes. Essas causam problemas físicos e psicológicos, reduzindo o tempo de trabalho e até mesmo a vida dos indivíduos. Atualmente, os métodos de tratamento de doenças autoimunes possuem eficácia limitada e são repletos de efeitos colaterais, além de possuírem alto custo. Uma melhor compreensão da etiologia e patogênese de doenças autoimunes e o desenvolvimento de tratamentos mais específicos têm importante implicação, não somente para o paciente, mas também para o sistema de saúde e o setor sócio-econômico em geral, contribuindo também para o melhor detalhamento do funcionamento do sistema imune (OLSSON e cols., 2006).

Pênfigo é um conjunto de doenças autoimunes caracterizado pela presença de bolhas na pele, provocadas por autoanticorpos patogênicos com especificidade para diferentes moléculas componentes da epiderme.

Alguns genes da região genômica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), estão envolvidos na etiologia da doença pênfigo foliáceo (PF). Muitas doenças autoimunes, entre as quais doença celíaca, artrite reumatóide e diabetes tipo I, estão associadas à presença de variantes dos genes HLA clássicos, principalmente daqueles que codificam as moléculas de classe II (HLA-DR e DQ). Essas moléculas determinam o antígeno que se ligará na fenda da molécula HLA de classe II e será apresentado ao linfócito T. Essa interação do peptídeo antigênico com a molécula HLA e o receptor de célula T é o ponto crucial para o desenvolvimento da resposta imune. Alterações no padrão dessas respostas contribuem para o surgimento de doenças autoimunes.

Os estudos de associação entre os genes *HLA-DQA*, *DQB* e *DRB* permitiram elaborar algumas hipóteses para explicar a patogênese do PF. Estas poderão ser avaliadas pela resposta humoral e celular ao autoantígeno DSG1 e seus peptídeos sintéticos, em estudos funcionais com moléculas HLA nos pacientes com PF.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Os pênficos são dermatoses vésico-bolhosas autoimunes, caracterizadas pela presença de anticorpos do tipo IgG dirigidos contra glicoproteínas presentes nos desmossomas (SAMPAIO e cols., 1994; YOLES e cols., 2001). A ligação antígeno-anticorpo promove a perda de adesão celular, levando ao processo de acantólise.

Os pênficos apresentam-se de formas variadas e sua classificação está descrita na Tabela 1 (SAMPAIO e cols., 1994; DE OLIVEIRA e cols., 2003).

Nos pênficos vulgar (PV) e foliáceo (PF) houve reprodução clínica, histo e imunopatológica da doença em modelos experimentais murinos após transferência passiva de autoanticorpos, comprovando a patogenicidade dos autoanticorpos no desenvolvimento da doença (DIAZ e cols., 1989a).

O pênfico foliáceo endêmico (PFE), também conhecido como fogo selvagem (FS) é de extrema importância no Brasil, pois associa aspectos endêmicos à autoimunidade. Do ponto de vista clínico e imunológico, o PF assemelha-se à forma clássica. Entretanto, a ocorrência em crianças e adultos jovens, a presença de casos familiares e a identificação de áreas endêmicas (principalmente no território brasileiro) fazem do PF uma doença com características únicas (DIAZ e cols., 1989a; DIAZ e cols., 1989b).

2.2.1 Histórico e aspectos epidemiológicos

Pênfigo foliáceo caracteriza-se pela presença de autoanticorpos anti-epidérmicos que reconhecem a glicoproteína desmogleína 1 (DSG1) (JONES e cols., 1984). Enquanto PF e PFE são idênticos clínica, histológica e sorologicamente, as características epidemiológicas do PFE são distintas. A grande maioria dos casos de PF na América do Norte, Europa e Ásia são esporádicos, sem evidências de agrupamentos geográficos. A idade média do início de manifestação da doença encontra-se entre 50-60 anos. Na França, a incidência de casos é $1-2 \times 10^{-6}$ casos por ano, sendo 80% desses, pênfico vulgar. A proporção sexual de mulheres/homens afetados é 2:1 (BASTUJI-GARIN e cols., 1995).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS PÊNFIGOS

Variantes	Auto-anticorpos	Principais auto-anticorpos
Pênfigo Foliáceo Clássico	IgG	Desmogleína 1
Pênfigo Foliáceo Endêmico	IgG	Desmogleína 1
Pênfigo Vulgar	IgG	Desmogleína 3 e/ou 1
Pênfigo herpetiforme	IgG	Desmogleína 3 e/ou 1
Pênfigo droga-induzido	IgG	Desmogleína 3 e/ou 1
Pênfigo por IgA (tipo SPD)	IgA	Desmocolina 1
Pênfigo por IgA (tipo IEN)	IgA	Desconhecido
Pênfigo paraneoplásico	IgG	Desmogleína 3; BP230 Desmoplaquinas 1 e 2 Periplaquinas Plectina Proteína de 170 kD

NOTA: SPD - dermatose pustulosa subcórnea; IEN - intraepidérmico neutrofílico

FONTE: de OLIVEIRA e cols. (2003)

A forma endêmica é encontrada principalmente na América Latina (Brasil, Colômbia e Peru) e na Tunísia (HEIMGARTNER e cols., 1976; ROBLEDO e cols., 1988; MORINI e cols., 1993). É interessante notar que as características epidemiológicas nestas duas regiões não só diferem da forma clássica como também entre si. Na Tunísia a incidência é $6-7 \times 10^{-6}$ casos por ano, dos quais 61% são PF. A proporção sexual de mulheres:homens afetados é 4:1. A incidência de casos entre mulheres de 20-34 anos é 20×10^{-6} / ano (BASTUJI-GARIN e cols., 1995). No Brasil, a incidência de casos é cerca de $25-35 \times 10^{-6}$ / ano, com proporção sexual de 1:1 (DIAZ e cols., 1989b).

Devido à maior ocorrência de PF na América do Sul e, sobretudo, no Brasil, durante um determinado período de tempo essa doença foi conhecida como pênfigo

foliáceo sul-americano e pênfigo foliáceo brasileiro. A partir do final da década de 1980, a doença passou a ser chamada de pênfigo foliáceo endêmico (PFE). Essa designação reflete, com mais precisão, sua principal característica diferencial – a endemicidade (CAMPBELL e cols., 2001). Assim, o PF é a única doença, das conhecidas atualmente, que possui característica autoimune e, ao mesmo tempo, endêmica.

O PFE é uma doença que acomete principalmente trabalhadores rurais, exibindo tipicamente agrupamento familiar e geográfico. Ocorre principalmente em crianças e adultos jovens, entre a segunda e terceira décadas de vida, de qualquer etnia ou gênero, que vivam ou trabalhem em áreas rurais endêmicas e, principalmente, próximas a rios (CAMPBELL e cols., 2001).

Também chamado de fogo selvagem devido à sensação de queimadura proveniente das lesões descrita pelos indivíduos afetados, o PF é endêmico em certos estados do Brasil como Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde mais de 15.000 casos foram registrados até 1982 (DIAZ e cols., 1989a). O primeiro caso documentado de FS no Brasil foi citado por Aranha Campos. Ele descreveu dois casos de FS que apareceram no interior de São Paulo na região de Franca na segunda metade do século 19 (HANS-FILHO e cols., 1999). Com o aumento significativo do número de casos de FS, pacientes não tinham onde receber tratamento adequado. Foram construídos hospitais especializados que se dedicaram ao estudo e tratamento da doença, nos estados que apresentavam maior número de pacientes. O primeiro, Hospital Adhemar de Barros, foi inaugurado em 1940. Localizado em São Paulo (SP), dedicava-se especialmente a tratar e reabilitar pacientes, além de pesquisar a doença. Depois, foi criado o Hospital do Pênfigo de Goiânia (GO) em 1952, seguido pelo Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) (LOMBARDI e cols., 1992).

Foi observada prevalência particularmente elevada do FS em algumas populações indígenas brasileiras, tais como Xavantes, Terenas, Kadiwéu, entre outras. A reserva ameríndia de Limão Verde, localizada no estado do Mato Grosso do Sul, possui cerca de 1200 habitantes da tribo Terena e é um foco ativo da doença, que possui 3,4% de prevalência neste local (WARREN e cols., 2000b). Em Xavantes a prevalência é de 1,4% (HANS-FILHO e cols., 1996). Estes pacientes indígenas possuem perfil semelhante ao de outros focos endêmicos, tais como

habitações humildes e rústicas, e poucos recursos sócio-econômicos. Este quadro encontra-se agravado pelas características de vida desses pacientes, que necessitam do campo para sua subsistência, estando bastante expostos à incidência de raios ultravioleta (CAMPBELL e cols., 2001).

A partir da segunda metade da década de 1970, ocorreu a redução da endemia. Esta praticamente desapareceu em focos importantes, como São Paulo e norte do Paraná. Na região Centro-Oeste ocorreu estabilização com redução significativa no número anual de novos casos. Iniciou-se a fase de declínio da endemia e estabilização de focos que se estende até hoje.

CHIOSSI e cols. (2001) realizaram um levantamento do número de casos de PFE ocorridos entre 1973 e 1998 na região nordeste do estado de São Paulo, e verificaram que a incidência média da doença é de 9,4 casos por ano, ocorrendo principalmente na população branca (70,2%) e no gênero feminino (60,4%). A idade varia entre 7 e 82 anos, sendo que 46,9% dos indivíduos afetados residem em áreas rurais. Em relação à profissão, 67,6% das mulheres afetadas são donas-de-casa ou empregadas domésticas, enquanto 40,2 % dos homens são trabalhadores rurais. Em 62,0% dos pacientes, a duração da doença após início do tratamento foi menor que um ano; em 27,0%, entre 1 e 5 anos e em 11,0%, maior que 5 anos. Em relação à procedência, 36,7% eram provenientes da região de Ribeirão Preto e Batatais, 22,0% da região de Franca, 13,5% da região de Araraquara, 2,9% da região de Barretos e 4,1% de outras regiões do estado de São Paulo. Já 20,8% dos pacientes eram de outros estados (16,7% de MG). Treze (5,3%) pacientes relataram PFE em algum familiar e 4 (1,6%) em vizinhos (CHIOSSI e cols., 2001).

Já no estado do Mato Grosso do Sul, CHAGAS e cols. (2005) demonstraram através dos dados de 307 pacientes que o PFE mantém-se ativo naquele estado, com média de 30,7 casos anuais (dados de 1990-1999), predomínio de casos nos meses de dezembro a março e maio, em indivíduos que desempenham ocupações categorizadas como do lar e trabalho rural, onde 52,8% dos afetados são do gênero feminino. O número de casos em cada microrregião evidencia um corredor norte sul que coincide com o divisor de águas entre as bacias do rio Paraguai e Paraná.

Assim, a história epidemiológica do FS segue trajetória coincidente com o desbravamento e ocupação de regiões do território brasileiro, com ascensão seguida de queda da endemia (CAMPBELL e cols., 2001). A região nordeste do estado de

São Paulo e o estado do Mato Grosso do Sul permanecem como focos endêmicos remanescentes de FS.

2.2.2 Quadro Clínico, classificação, diagnóstico e tratamento

As lesões cutâneas primárias são bolhas superficiais que se rompem facilmente. Essas podem encontrar-se transformadas em discretas erosões, escama fina e aderente ou em pequena crosta hemorrágica. É bastante comum o líquido da bolha conter bactérias que, com o rompimento e ressecamento, deixam escamas e crostas amareladas. As lesões iniciam-se de forma branda, pela cabeça, seguindo pelo pescoço, espalhando-se em seguida pelo corpo todo após algumas semanas ou meses. Na maioria dos pacientes, as lesões concentram-se principalmente em regiões da pele expostas ao sol. Face e couro cabeludos são locais sempre acometidos no FS. Raramente a doença é aguda e fulminante, com disseminação das lesões em uma a três semanas (HANS-FILHO e cols., 1999).

Clinicamente, há três formas de pênfigo foliáceo: a forma localizada, a generalizada e a hiperpigmentada (DIAZ e cols., 1989a; HANS-FILHO e cols., 1999, CAMPBELL e cols., 2001).

Pacientes que apresentam a forma localizada possuem lesões, na maioria das vezes, limitadas às áreas seborréicas da pele. Essas lesões são vesículas e pequenas bolhas que se rompem rapidamente, deixando áreas erosivas secundárias e crostas, podendo também ser eritematosas, violáceas ou pápulas hiperpigmentadas. A maioria dos pacientes permanece com essas lesões estabilizadas. Alguns, porém, podem apresentar disseminação das lesões para o tronco, abdômen e membros superiores e inferiores, evoluindo para a forma generalizada (CAMPBELL e cols., 2001).

A forma generalizada (Figura 1) possui três tipos clínicos distintos. O primeiro é uma forma bolhosa-esfoliativa, e se manifesta em pacientes na fase aguda da doença. Pacientes nessa forma clínica podem desenvolver erupção variceliforme de Kaposi se expostos ao vírus do herpes. O segundo inclui pacientes que desenvolvem eritroderma esfoliativo. Já a terceira forma inclui pacientes que manifestam placas ceratóticas generalizadas e lesões nodulares.

Ao contrário das demais, a forma hiperpigmentada está associada à remissão

da doença. Podem-se restringir as áreas de lesões prévias, ou ser difusa e envolver regiões não afetadas anteriormente. Antes do estabelecimento de tratamento com esteróides, essa característica era conhecida como aurora da cura, alterando a coloração da pele dos pacientes, na qual caucasóides adquirem tonalidade de pele mais escura, e pessoas de ancestralidade mista européia e africana assemelham-se a africanos e estes adquirem uma coloração de pele cinza-azulada (CAMPBELL e cols., 2001).

O diagnóstico é baseado em sintomas clínicos, realizado por especialistas em dermatologia. O exame histológico permite a detecção da acantólise. Algumas bolhas intra-epidérmicas podem apresentar espongiose e estar repletas de neutrófilos e eosinófilos (CAMPBELL e cols., 2001). Uma das formas de diferenciação entre FS e PV é através da observação da ausência de lesões orais em FS. A imunofluorescência indireta (IFI) revela autoanticorpos em pacientes com FS em níveis distintos que podem ser associados com a atividade da doença (CAMPBELL e cols., 2001).

A doença é tratada basicamente com glicocorticóides por via oral, sendo prednisona a droga mais comumente administrada aos pacientes (dose diária: 1 a 2 mg/kg). A dose deve ser reduzida a cada semana, a partir de indícios de melhora clínica. Caso ocorra infecção bacteriana secundária, antibióticos sistêmicos devem ser administrados. Localmente, banhos de permanganato de potássio na diluição de 1/40.000 podem ajudar na cicatrização e amenizar a sensação de ardência nos locais das lesões (CAMPBELL e cols., 2001).

2.2.3 Etiologia

A endemicidade do PF gerou suspeita de que algum fator ambiental esteja contribuindo para a sua patogênese. As atenções se voltaram para a presença de mosquitos “borrachudos” nos focos da doença. Estes insetos hematófagos, pertencentes à família Simuliidae, vêm promovendo discussões desde a década de 40, de que o fator desencadeante do pênfigo possa ser um vírus ou alguma substância salivar desse inseto, transmitida durante a picada (DIAZ e cols., 1989b; LOMBARDI e cols., 1992). Um estudo caso-controle epidemiológico comparou um grupo de 52 pacientes com FS com outro grupo de 52 pacientes portadores de

outras dermatoses, e através de questionários, foi realizado um levantamento dos fatores de riscos ambientais aos quais estes pacientes foram expostos durante um período de cinco anos. O único fator de risco que apresentou significância estatística com razão de probabilidade diferente de um ($OR \neq 1$) foi a picada de simuliídeos ($OR= 4,7$; $P < 0,001$) (LOMBARDI e cols., 1992). Um levantamento realizado em 1998, na reserva de Limão Verde (MS) e áreas vizinhas, caracterizou a distribuição de nove espécies de *Simulium* em regiões que possuem ou não focos da doença. Apenas a espécie *Simulium nigrimanum* apresenta habitat coincidente com as áreas endêmicas, estando em maior abundância quando comparada com as outras espécies residentes nessas mesmas áreas (LOMBARDI e cols., 1992; EATON e cols., 1998).

FIGURA 1 – PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DE PF



FONTE: Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande – MS)

Estudos revelaram que a resposta de anticorpos no FS exibe heterogeneidade limitada, com padrão de bandejamento de IgG oligoclonal, quando testados com antígenos epidérmicos por *immunoblotting* de afinidade (CALVANICO e cols., 1993). A recente análise das regiões variáveis das cadeias leve e pesada de autoanticorpos anti-desmogleína 1 sugere que a resposta é, de fato, antígeno-específica (QYAN e cols., 2008). Nesse estudo, 77 hibridomas foram gerados a partir de células B de 8 pacientes com FS e um paciente em estágio pré-clínico, que veio a manifestar a doença 4 anos depois. Entre os hibridomas analisados, foram encontrados grupos relacionados de anticorpos anti-DSG1 de clonalidade múltipla, em cada paciente individualmente. Observou-se também, desvios na aleatoriedade de uso do

segmento gênico variável (V), tanto para a cadeia leve como para a pesada nos hibridomas do tipo IgG. Além disso, a maioria desses hibridomas exhibe desvios favorecendo mutações de troca de aminoácido na região determinante de complementariedade (CDR), que são porções das regiões variáveis da molécula de anticorpo (imunoglobulina) que se projetam do domínio variável e fazem contato e ligação a antígenos. Ambos os fatos relatados são sinais de seleção antigênica.

Um fato interessante é que os hibridomas gerados a partir de células B de pacientes em estágio pré-clínico também exibem, assim como os pacientes na forma ativa da doença, esse perfil de seleção antigênica e possuem importante sobreposição do uso do segmento gênico variável da cadeia pesada (V_H) das imunoglobulinas durante o rearranjo gênico para formação do receptor de linfócito B (LB). Os hibridomas gerados a partir de células de pacientes em estágios pré-clínico e clínico compartilham várias mutações de troca de aminoácido sugerindo que haja seleção pelo mesmo ou similar antígeno. Esses achados sugerem que a seleção antigênica é um processo que ocorre bem antes do início da manifestação da doença (QYAN e cols., 2008). É importante procurar identificar o fator ambiental desencadeador da doença, e certamente essa relação com a presença de *Simulium nigrimanum* nas áreas endêmicas deve ser investigada a fundo.

Outros aspectos exógenos, tais como fatores nutricionais e ambientais, podem contribuir para a etiologia da doença. Foi proposto que o grupo tiol (R-SH), presente em alimentos e na água, poderia ser um dos fatores desencadeantes do pênfigo (LOMBARDI e cols., 1992; BRENNER e cols., 1994). O tiol pode ser encontrado em alimentos tais como o alho, a cebola e o alho-poró. O fenol, presente em alimentos como a manga, a castanha de caju, a mandioca e o guaraná, também foi apontado (TUR e cols., 1997; TUR e cols., 1998) como candidato a contribuir para a indução do pênfigo. A análise da água consumida nas regiões endêmicas indicou a presença de taninos (polifenóis). Quando ocorrem cheias, o tanino das regiões ribeirinhas estaria sendo lixiviado. Em seguida foi proposto que a exposição combinada a todos esses agentes poderia contribuir na indução da doença (BRENNER, 1999).

Além disso, vários outros fatores podem estar envolvidos na patogênese da doença. Nem todos os indivíduos de uma região endêmica desenvolvem o pênfigo foliáceo, levantando a hipótese de que a doença possa estar relacionada a uma combinação de fatores incomuns, que ainda podem estar ocorrendo em baixa

frequência no meio. Sugere-se a existência de fatores endógenos, inclusive genéticos, uma vez que se sabe que o genótipo é importante na susceptibilidade à maioria das doenças autoimunes.

2.2.4 O autoantígeno desmogleína 1

A identificação do autoantígeno no PF foi realizada na década de 80. Nesse estudo, comprovou-se que a desmogleína 1 (DSG1), glicoproteína de 160 kDa, é o autoantígeno tanto do pênfigo foliáceo clássico, quanto do endêmico (STANLEY e cols., 1986).

Existem duas formas de caderinas, as chamadas clássicas, localizadas nas junções aderentes (caderina-E e caderina-P) e as desmossomais, localizadas nos desmossomos (desmogleína 1, 2 e 3) (BUXTON e cols., 1993).

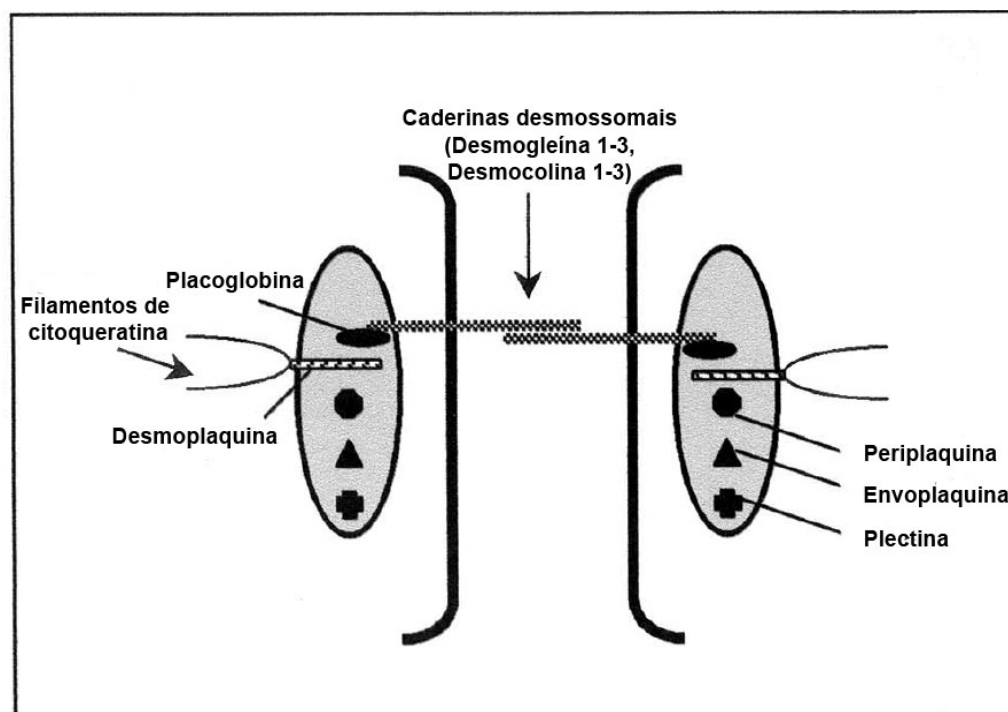
Os desmossomos formam regiões pontuais de adesão entre as células e encontram-se ancorados ao citoesqueleto de filamentos intermediários, estando relacionados à forma e ao padrão de distribuição das organelas em diferentes tipos celulares. Além disso, conferem resistência à tração e à pressão. Um desmossomo consiste de duas placas circulares formadas pelas proteínas placoglobinas e desmoplaquinas, uma em cada célula. De ambas as placas partem filamentos constituídos por outras proteínas, desmogleínas e desmocolinas, que atravessam as membranas plasmáticas e atingem o espaço entre as células, onde se associam com a mesma estrutura na célula vizinha, promovendo a adesão celular (Figura 2).

A DSG1 pertence a superfamília das caderinas, que são moléculas de adesão dependentes de cálcio (Ca^{++}). As caderinas promovem a adesão celular e mantêm a integridade celular. São proteínas transmembrânicas cujo domínio intracelular está envolvido com funções de adesão e integridade do citoesqueleto, enquanto a porção extracelular está envolvida com a adesão célula-célula, sendo alvo da patogênese do PF, através do reconhecimento de seus epítomos.

O domínio extracelular N-terminal das caderinas foi visualizado por cristalografia de raio-X e mostrou estar envolvido em dois tipos de interação: formação de fitas laterais de dímeros e de dímeros adesivos. RICKMAN e cols. (1999) descreveram a primeira mutação em uma caderina componente do desmossomo, a qual remove uma porção altamente conservada do primeiro domínio

extracelular. Essa mutação ocorre no gene que codifica a DSG1, resultando na deleção da primeira folha β e parte da segunda folha β , que juntas formam a primeira repetição do domínio das caderinas e parte do primeiro sítio de ligação ao Ca^{++} . Essas alterações comprometem a formação do dímero de adesão e causam uma doença conhecida como queratoderma palmoplantar estriado do tipo I, herdado de modo autossômico dominante. AMAGAI e cols. (1991) demonstraram que a DSG1 é o alvo de anticorpos autorreativos no PF, enquanto a desmogleína 3 é o alvo de anticorpos autorreativos no PV.

FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO DESMOSSOMO



LEGENDA: A placa desmossomal é um complexo macromolecular no qual dois grupos de proteínas encontram-se individualizados. O 1º grupo inclui proteínas do grupo das plaquinas, que se ligam aos filamentos de citoqueratina (desmoplaquina, periplaquina, envoplaquina e plectina). O 2º grupo inclui proteínas que se ligam ao domínio intracelular das caderinas (placoglobina e placofilina). A desmoglea é composta por glicoproteínas de adesão transmembrânicas que pertencem à superfamília das caderinas (desmogleínas e desmocolinas), que interagem de modo semelhante no espaço intercelular.

FONTE: modificado de MARTEL e cols. (2001)

A DSG1 possui 5 domínios extracelulares (Figura 3) e é codificada por um gene polimórfico, localizado no cromossomo 18. Vários estudos de análise genética de susceptibilidade à doença analisaram o gene que codifica a DSG1 e já foram

encontrados polimorfismos no éxon 7 na posição 809 (C,T), que promove uma troca sinônima no segmento do gene que codifica o segundo ectodomínio (EC2), e no éxon 11, que codifica o quinto domínio extracelular (EC5) e parte do quarto domínio extracelular (EC4). Nesse éxon já foram relatadas variantes polimórficas nos nucleotídeos 1555 (A,C), 1570 (C,A), 1660 (A,C) e 1686-1690 (inversão AAAGA ↔ AGAAA) (MARTEL e cols., 2001).

Devido ao desequilíbrio de ligação, somente dois haplótipos com as variantes polimórficas do exon 11 do gene *DSG1* foram encontradas na população européia. Os polipeptídeos codificados pelos dois haplótipos diferem em 5 aminoácidos. A associação entre PF e o genótipo 809 C/C foi encontrado em franceses e tunisianos, porém não em brasileiros (MARTEL e cols., 2001; AYED e cols., 2002; PETZLERLER e cols., 2005). Levando em conta a ausência de associação entre variantes do éxon 11 e PF, acredita-se que variações estruturais na proteína em EC4-EC5 não contribuam para a susceptibilidade diferencial à doença. Além disso, indivíduos sadios residentes em áreas endêmicas possuem anticorpos contra EC5. Entretanto, vários pesquisadores caracterizaram epítomos conformacionais reconhecidos por anticorpos presentes no soro de pacientes com PF e demonstraram que epítomos autoimunes dominantes estão localizados na porção NH₂ terminal, principalmente em EC1 (MARTEL e cols., 2001; SEKIGUCHI e cols., 2001; PETZLERLER e cols., 2005).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DA DSG1



LEGENDA: A porção extracelular da desmogleína 1 possui 4 domínios pertencentes à família das caderinas (EC1 a EC4) e um domínio críptico, próximo à membrana (EC5). Essa proteína também possui uma porção transmembrânica, seguida por uma porção na parte interna do queratinócito (citoplasmática), a qual se liga proteínas da placa desmosomal. Os traços verticais pretos representam os 6 domínios de ligação potencial ao Ca⁺⁺ encontrados nas repetições de domínio da família das caderinas.

FONTE: modificado de LIN e cols. (2003).

2.2.5 Estudos de associação entre genes HLA e PF

O componente genético pode ser verificado no PF, através da análise da frequência mais elevada dessa doença em indivíduos geneticamente relacionados do que entre indivíduos não relacionados. O risco para consangüíneos é muito inferior à proporção esperada pelos padrões simples de herança, logo acredita-se que vários genes estejam contribuindo para a susceptibilidade da doença. Dessa forma, o PF enquadra-se na categoria das doenças multifatoriais. Entre os vários possíveis genes envolvidos na etiologia desta doença, há diversos genes cujos produtos atuam no desencadeamento da resposta imune, que pode ser influenciada em parte pelos fatores ambientais vistos anteriormente.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) é um complexo de genes localizados no braço curto do cromossomo 6, que codificam moléculas de superfície necessárias para a apresentação de antígenos às células T. Também conhecido como sistema HLA (antígenos leucocitários humanos), seus genes estão agrupados em 3 classes: (i) genes HLA de classe I, (ii) genes HLA de classe II e genes HLA de classe III (Figura 4) (BALLOTTI e cols., 2006a).

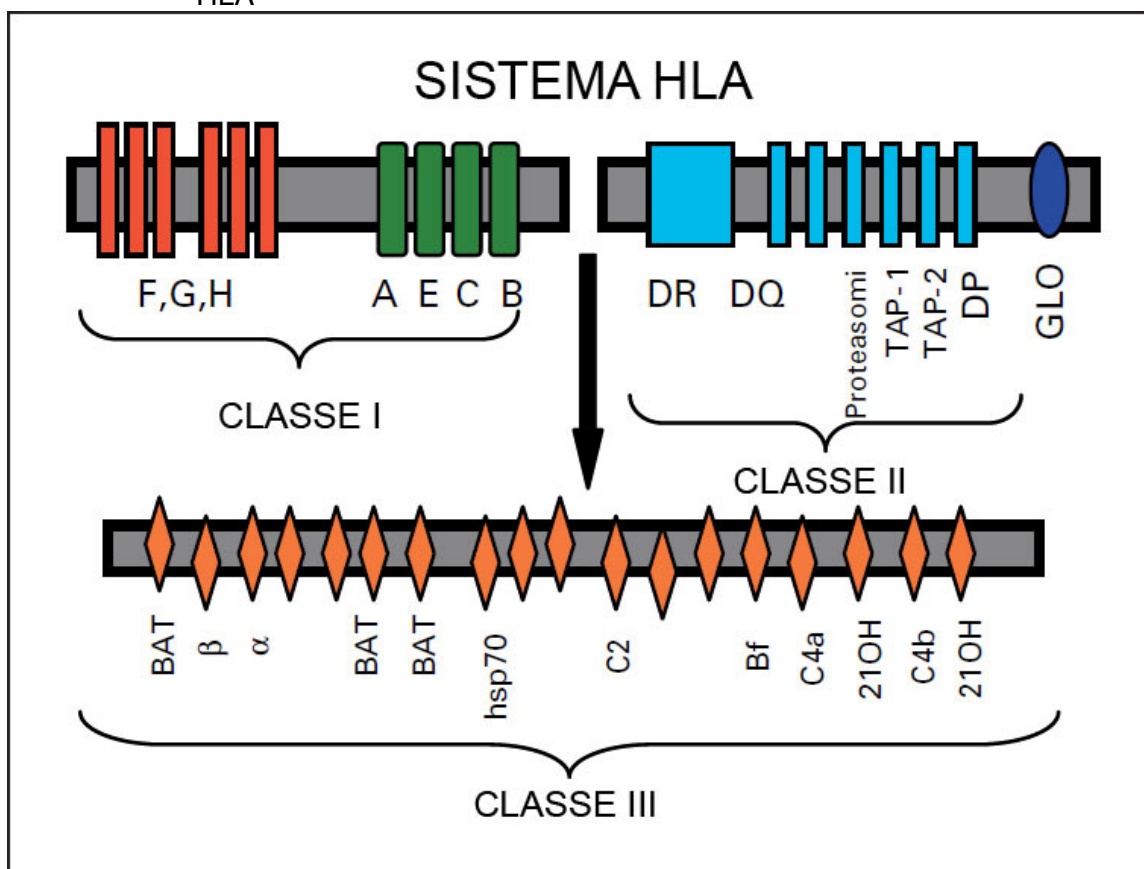
As moléculas HLA de classe I são proteínas heterodiméricas de membrana, expressas por quase todas as células nucleadas, que atuam apresentando antígenos aos LT CD8⁺. A cadeia α é codificada por genes de classe I do complexo CPH. Essa cadeia associa-se de forma não-covalente à β_2 -microglobulina. As moléculas HLA de classe II são proteínas heterodiméricas, e ambas as cadeias α e β são codificadas por genes de classe II do CPH. São expressas pelas células apresentadoras de antígenos e atuam apresentando antígenos aos LT CD4⁺. Já os genes HLA de classe III codificam várias proteínas envolvidas na resposta imune, entre elas, alguns componentes do sistema complemento e os fatores de necrose tumoral α e β (KINDT e cols., 2008).

A nomenclatura dos antígenos HLA determinados por sorologia utiliza a denominação do *locus* gênico (por exemplo, *HLA-A*, *HLA-DR*), seguida pela identificação numérica do antígeno (por exemplo, *HLA-A1*, *HLA-DR1*). A definição do *locus* C incorpora a letra "w" (por exemplo, *HLA-Cw1*, *HLA-Cw2*) para diferenciá-la do sistema complemento (MARSH e cols., 2002).

A nomenclatura dos alelos HLA definidos por biologia molecular varia na

dependência da classe. Para classe I, a nomenclatura usa a denominação *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* para designar os antígenos definidos por sorologia. Em seguida, coloca-se um asterisco para identificar o método como sendo de biologia molecular (por exemplo, *HLA-A**), e acrescentam-se de quatro a oito dígitos (por exemplo, *HLA-A*0201*). Os dois primeiros dígitos referem-se à tipificação sorológica do antígeno; o terceiro e o quarto referem-se às denominações dos alelos específicos. Para o HLA de classe II, o procedimento é um pouco distinto. Após a designação do HLA e seu *locus* gênico, acrescentam-se a letra "A" ou "B" para representar as cadeias polimórficas α e β do *HLA-DR*, *HLA-DP* e *HLA-DQ*. Como algumas regiões possuem diversos genes para as cadeias α e β , cada *locus* recebe um número correspondente (por exemplo, *HLA-DRB1*) (MARSH e cols., 2002).

FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO ESQUEMÁTICA DOS LOCI GÊNICOS DO SISTEMA HLA



LEGENDA: o CPH encontra-se dividido em três agrupamentos gênicos. Os genes HLA de classe I são divididos em clássicos (verde) e não-clássicos (vermelho). Entre os genes HLA de classe I e classe II (azul), está situado o agrupamento gênico HLA de classe III (laranja).

FONTE: modificado de Balotti e cols (2006).

Vários estudos investigaram genes do CPH e mostraram forte associação de alelos *HLA* com doenças autoimunes e, em particular, com os pênfigos vulgar e foliáceo (BALLOTTI e cols., 2006a).

PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989) demonstraram que dois dos genes *HLA* de classe II envolvidos na susceptibilidade ao PF são *HLA-DR* e *HLA-DQ*, através de estudo realizado em uma população sul-brasileira de origem predominantemente européia. Foram detectadas associações positivas entre pênfigo foliáceo e *HLA-DR1*, com risco relativo (RR) 6,4, e *-DR4* (RR=3,3), e associações negativas com *-DR7* (RR=0,06) e *-DQ2* (RR=0,27). Concluíram que os haplótipos *HLA-DR1-DQw1* e *-DR4-DQw3* são marcadores de susceptibilidade para FS, enquanto *-DR7-DQw2* e *-DR3-DQw2* são marcadores para resistência aumentada contra FS. Foi detectada a ausência de associação com os genes *HLA-A*, *-B* e *-C*. Através destes resultados, demonstrou-se que os pacientes com a doença tendem a compartilhar alelos *HLA* de classe II específicos (PETZL-ERLER e cols., 1989).

MORAES e cols. (1991) detectaram uma associação positiva com *DRB1*0102* (RR=7,3), pertencente ao grupo sorológico DR1 e uma associação negativa com *DQB1*0201* (grupo sorológico DQw2) ao estudarem 38 pacientes com FS e 50 controles, todos provenientes de áreas endêmicas. Estes resultados corroboram as associações encontradas por PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989). O alelo de susceptibilidade encontrado nesse estudo difere de *DRB1*0101* nas posições que codificam os aminoácidos 85 e 86, concluindo aqueles autores que estes aminoácidos possam estar envolvidos na formação de um bolso de ancoramento que apresentaria um epítipo do autoantígeno aos linfócitos T, determinando conseqüentemente a predisposição à doença (MORAES e cols., 1991).

Através da análise de 10 pacientes e 74 controles sadios da tribo indígena Xavante, mostrou-se associação positiva entre FS e *DRB1*0404* (RR=9,6). Todos os pacientes possuíam esse alelo ou *DRB1*1402*, porém este último não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles (CERNA e cols., 1993).

Outro grupo de pesquisadores confirmou essa associação com *DRB1*0404*, através da análise de alelos do gene *HLA-DRB1* em uma população de índios Terena (MS). Aumentos não significativos de *DRB1*1402* e *DRB1*1406* também foram observados nesse estudo. Segundo eles, os polipeptídeos codificados por

estes alelos compartilham uma sequência de aminoácidos LLEQRRAA (definida como epítipo) nas posições 67-74, localizadas na terceira região hipervariável da molécula, propondo que alelos cujas sequências nucleotídicas codifiquem esta sequência de aminoácidos predisponham ao PF (MORAES e cols., 1997). Nesse caso, variantes alélicas de genes do sistema HLA de indivíduos expostos aos possíveis agentes etiológicos desencadearão ou não a formação de autoanticorpos contra antígenos epidérmicos, de acordo com sua capacidade relativa de conferirem susceptibilidade ou resistência à doença (CAMPBELL e cols., 2001).

Estudos realizados com pacientes franceses confirmaram as associações previamente descritas de PV com os alelos *DRB1*0402*, **1401* e **1404* e *DQB1*0503* e mostraram que os alelos *DRB1*0102* e **0404* estão associados ao PF na França (LOISEAU e cols., 2000).

PAVONI e cols. (2003) encontraram associação positiva com PF para os alelos *DRB1*0101*, **0102*, **0103*, **0404*, **0406*, **0410*, **1406* e **1601*, e associação negativa para *DRB1*0301*, **0701*, **0801*, **1101*, **1104* e **1402*, ao analisar 147 pacientes e 182 indivíduos controles. Através da análise das diferentes combinações genotípicas, foi demonstrado que a interação entre alelos de resistência, susceptibilidade e neutros desviam-se claramente do modelo co-dominante. Possíveis discrepâncias entre os alelos associados ao PF nos diferentes estudos podem ser atribuídas a diferenças na composição étnica das populações analisadas, que podem diferir no repertório e frequência dos alelos de cada loco HLA. Apesar de alelos que compartilham o motivo LLEQRRAA também estarem associados à doença neste estudo, outros que não possuem esta sequência foram igualmente associados, evidenciando que outras características das moléculas HLA também são importantes no mecanismo de autoimunidade.

Linfócitos T são capazes de reconhecer antígenos específicos somente quando estes encontram-se associados com as moléculas apresentadoras de antígenos codificadas pelo CPH, presentes na superfície celular. Polimorfismos genéticos são fundamentais para a diversidade estrutural da molécula HLA, permitindo a interação com diferentes peptídeos processados (SHLOMCHIK e cols., 2004). Peptídeos apresentados pelas moléculas HLA de classe I geralmente contém de 8 a 10 aminoácidos. Já os peptídeos apresentados pelas moléculas HLA de classe II podem conter de 13 a 18 aminoácidos. Nas moléculas HLA, o sulco no qual o

peptídeo é encaixado possui vários resíduos de ancoramento (“*pockets*”). Esses aminoácidos de ancoramento podem variar de acordo com o polimorfismo dos alelos dos genes HLA que estão codificando as moléculas apresentadoras de antígenos. Dessa forma, diferentes peptídeos podem ser ancorados ao sulco da molécula HLA e apresentados às células T (KINDT e cols., 2008).

Através da análise dos sulcos de ancoramento das moléculas HLA codificadas pelos alelos associados às doenças (Tabela 2), incluindo o alelo *DRB1*0406*, associado a PV em japoneses (YAMASHINA e cols., 1998), foi observado que: (i) no PV, dois tipos de peptídeos de DSG3 podem ser apresentados pelas moléculas HLA-DR, de acordo com o polimorfismo (alelos *DRB1*0402* ou **14/0406*); (ii) os mesmos peptídeos de DSG1 podem ser apresentados pelas moléculas codificadas pelos alelos *DRB1*0102* e **0404* e **14* no PF; (iii) as moléculas codificadas pelos alelos *DRB1*14/0406* no PV podem apresentar tanto peptídeos de DSG3, como de DSG1, contribuindo para explicar os casos de lesões muco-cutâneas no PV (LOISEAU e cols., 2000).

TABELA 2 – MOTIVOS DE PEPTÍDEOS QUE SE LIGAM ÀS MOLÉCULAS HLA-DR ASSOCIADAS A PV E PF

DRB1*	DR pocket				
	P1	P4	P6	P7	P9
0402	VLMIF	KR	STNQK	HKN	AGH
		ñ DE		PQR	NQS
	VLMIF	LAIV	AGSTP		ALV
0101	WY	MNQ			INFY
		ñ HKR			
	VLMIF	ALIV	STNQR	ADHIL	ALV
0404		WDEFY		MNPST	QGSK
		ñ KR			
	VLMIF	ALIV	AGSTP		ALV
0102		MNQ			INFY
		ñ HKR			
	VLMIF	ALIV	ST		ALV
0102 e 0404		DE	aa sem carga		ñ DE
		ñ HKR			

LEGENDA: Os resíduos de aminoácidos estão representados utilizando o código de letras; ñ=não.

FONTE: LOISEAU e cols. (2000)

2.2.6 Resposta Humoral no PF

Uma vez que o antígeno ambiental tenha ativado o sistema imune, a resposta de LB pode ser estudada em termos de resposta de subclasses de IgG, dando alguns indícios sobre a natureza da patogênese da doença. Estudos têm revelado que os autoanticorpos IgG em pacientes com PF são isotipo-restritos e a maioria dos anticorpos patogênicos são da subclasse IgG4 (ROCK e cols., 1989; WARREN e cols., 2003).

Estudos que analisaram as subclasses de IgG na resposta de anticorpos anti-DSG1 pela técnica de ELISA em pacientes com PF e indivíduos sadios da reserva de Limão Verde, mostraram que pacientes possuem níveis de IgG4 19,3 vezes maior que os indivíduos sadios (WARREN e cols., 2003). De modo similar, pacientes na fase ativa da doença possuem níveis similares de IgG1, porém 74,3 vezes mais níveis de IgG4 quando comparados com pacientes em fase de remissão.

A restrição de subclasse de IgG foi observada em 5 pacientes dos quais foram coletadas amostras de sangue antes e depois da manifestação clínica da doença. Os níveis de IgG1 aumentam 3,45 vezes com o início da doença, enquanto os níveis de IgG4 aumentam 103,08 vezes com o início da fase clínica da doença. Esses resultados podem indicar que a progressão da fase pré-clínica para a clínica da doença, e também a transição da remissão para a doença ativa, está estritamente relacionada com a troca de subclasse de IgG1 para IgG4. Esses resultados também sugerem que somente os autoanticorpos anti-DSG1 de pacientes com PF são incapazes de desencadear a doença. E mais, estudos de transferência passiva de anticorpos em modelos murinos mostraram que a subclasse IgG1 de um indivíduo normal (que só possui resposta IgG1) são incapazes de desencadear doença em doses de até 15mg/kg. De modo contrário, anticorpos IgG4 provenientes de pacientes na fase ativa da doença são capazes de desencadear PF em uma concentração 10 vezes menor (1,5 mg/kg) (LI e cols., 2003). Por fim, por meio dos estudos acima citados, tem-se sugerido que a resposta de anticorpos no PF exhibe uma resposta inicial do tipo IgG1, seguida por IgG4 na fase ativa da doença.

A resposta humoral restrita a anticorpos do tipo IgG4 em humanos já foi observada em pacientes com parasitoses (KURNIAWAN e cols., 1993), indivíduos submetidos a terapias de hiposensibilização para alergia (LARCHE e cols., 2006; ROSSI e cols., 2007), indivíduos que foram picados por abelhas (AALBERSE e cols.,

1983) e pacientes com pancreatite autoimune (HAMANO e cols., 2001). A resposta autoimune restrita a IgG4 também já foi observada em outras doenças vésicobolhosas autoimunes, incluindo PV (HERTL e cols., 1999; SITARU e cols., 2007). Entretanto, há informações limitadas sobre seu papel patogênico nas doenças de pele (SITARU e cols., 2007). KRICHELI e cols. (2000) identificaram anticorpos anti-DSG3 no soro de 91% dos pacientes com PV, pela técnica de *immunoblotting*, e também em 49% de indivíduos sadios relacionados com os pacientes. A distribuição de IgG1 e IgG3 foram similares nos dois grupos. Entretanto, IgG4 foi encontrada em 62% dos pacientes, porém em menos de 2% dos familiares desses. Em indivíduos sadios não relacionados, essa subclasse de imunoglobulina não foi encontrada. BHOL e cols. (1995) encontraram predominantemente resposta de IgG1 contra a DSG3 em parentes de pacientes com PV e pacientes em remissão, enquanto pacientes na fase ativa da doença exibiam resposta de IgG1 e IgG4.

Quando é considerado o papel patogênico dos anticorpos IgG4 no PF, observa-se que é possível que esses anticorpos reconheçam epítomos diferentes daqueles reconhecidos pelos anticorpos não patogênicos do tipo IgG1. Alternativamente, IgG4 tem função efetora que não está presente em IgG1, ou afinidade de ligação maior *in vivo* por DSG1.

Recentemente, foi descrita a prevalência relativamente alta de autoanticorpos IgM anti-DSG1 no soro de pacientes e indivíduos clinicamente sadios residindo em áreas rurais, dentro ou na vizinhança de áreas endêmicas, tais como a reserva indígena Limão Verde (DIAZ e cols., 2008). Pacientes com PF, outras doenças autoimunes bolhosas, bem como indivíduos de áreas urbanas, não possuem resposta significativa de IgM anti-DSG1. Notavelmente, mais de 50% dos soros de indivíduos sadios na faixa etária entre 5 e 20 anos, residentes na reserva Limão Verde, possuem autoanticorpos IgM anti-DSG1. Essa resposta é adquirida em determinado momento durante a infância, uma vez que neonatos com mães com FS não possuem anticorpos IgM anti-DSG1. Esses novos achados suportam a hipótese que antígenos ambientais sensibilizam indivíduos residentes nessas áreas rurais endêmicas. Além disso, esses achados ajudam a corroborar a hipótese de que o repertório de células B no PF é dirigido pelo antígeno durante a fase pré-clínica.

Enquanto estudos soro-epidemiológicos no FS sugerem que a resposta de autoanticorpos IgM anti-DSG1 pode ser secundária a exposição a antígenos

ambientais, há também a possibilidade que eles representem anticorpos IgM naturais.

Esses anticorpos naturais são conhecidos por ser poli-reativos e representar a primeira barreira contra infecções, eliminação de bactérias por ativação do complemento, fazendo uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (MANSON e cols., 2005). Muitos desses anticorpos IgM naturais reconhecem um ou mais antígenos-próprios (COUTINHO e cols., 1995), e são detectados na infância, persistindo por toda a vida do indivíduo (MOUTHON e cols., 1996). Também são indicadores de infecções recentes ou re-infecção por doenças virais, tais como rubéola (HAMKAR e cols., 2005), mononucleose (OBEL e cols., 1996), hepatite B (CHU, 2006), infecções bacterianas como, por exemplo, doença de Lyme (CERMAKOVA e cols., 2005), ou parasitoses tais, como toxoplasmose (MONTROYA, 2002; REIS e cols., 2006). Anticorpos IgM naturais contra antígenos próprios foram encontrados em doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LES) (FORGER e cols., 2004; FERREIRA e cols., 2005; LI e cols., 2005a; LI e cols., 2005b), anemia hemolítica autoimune (STAHL e cols., 2005b) e trombocitopenia autoimune (STAHL e cols., 2005a). Uma vez que a autoimunidade é um fenômeno fisiológico que decorre da capacidade dos linfócitos de reagir com componentes próprios, alguns pesquisadores propõem que autoanticorpos do tipo IgM anti-Ro em LES possam representar parte do repertório natural de IgM que leva à produção de autoanticorpos IgG patogênicos por espalhamento de epítomos em indivíduos geneticamente predispostos (FERREIRA e cols., 2005). Certamente, é intrigante que a poli-reatividade de IgM ou a razão IgG/IgM de anticorpos anti-dsDNA em LES possam modular a doença e o prognóstico em modelos murinos experimentais e pacientes com LES (FORGER e cols., 2004; WERWITZKE e cols., 2005; LI e cols., 2005b).

Em resumo, essas observações soro-epidemiológicas sugerem que a resposta de IgM no PF da reserva Limão Verde aparentemente origina-se de exposição recorrente e persistente a antígenos ambientais que compartilham epítomos similares a DSG1 presentes nessa e, possivelmente, em outras áreas endêmicas. A sensibilização inicia-se na infância e persiste por toda a vida desses indivíduos, resultando na produção de autoanticorpos anti-DSG1 IgM e IgG não patogênicos. Autoanticorpos anti-DSG1 IgG patogênicos e o aparecimento da fase clínica da

doença ocorre, subseqüentemente, somente em uma pequena fração de indivíduos geneticamente predispostos. Foi observado que a concentração de autoanticorpos anti-DSG1 IgM em pacientes com PF decresce enquanto ficam internados em hospitais metropolitanos, longe do seu ambiente nativo, devido à eliminação do contato com o estímulo ambiental existente nas áreas endêmicas (DIAZ e cols., 2008).

2.2.7 Resposta Celular no PF

Apesar da patogênese dos pênfigos ser mediada por autoanticorpos produzidos por células B desmogleína-específicas, células T autorreativas são necessárias para a ativação de LB. Vários grupos identificaram repostas proliferativas de LT CD4⁺ aos ectodomínios de DSG3 em pacientes com pênfigo vulgar (WUCHERPFENNIG e cols., 1995b; LIN e cols., 1997b; HERTL e cols., 1998a). Pacientes com PV que exibem respostas combinada de autoanticorpos tanto para DSG3, como para DSG1, também possuem células T que proliferam tanto em resposta a peptídeos de DSG3, como de DSG1 (LIN e cols., 1997a). O reconhecimento de peptídeos de DSG3 por LT CD4⁺ Th1 e Th2 é restrito aos alelos HLA *DRB1*0402* e *DQB*0503* associados ao PV, uma vez que as respostas proliferativas aos peptídeos de DSG3 podem ser inibidas por anticorpos anti-DR e anti-DQ (AHMED e cols., 1991; LIN e cols., 1997b; HERTL e cols., 1998b; VELDMAN e cols., 2003). Células de PV Th1 e Th2 reconhecem um grupo limitado de peptídeos DSG3 relacionados por possuir uma carga positiva similar na posição 4 (P4), a qual é necessária para a manutenção da conformação correta dentro das fendas da molécula apresentadora de antígeno (WUCHERPFENNIG e cols., 1995a; VELDMAN e cols., 2004b). É importante salientar que células T de indivíduos sadios que compartilham os mesmos alelos HLA associados tiveram respostas proliferativas similares de LT ao mesmo grupo de peptídeos, sugerindo que há perda de tolerância dentro da resposta humoral, mediada por LB (VELDMAN e cols., 2004b).

Clones de células T de pacientes com PF também reconheceram epítomos dos ectodomínios da DSG1. Nesse estudo, 13 de 15 pacientes responderam à proteína recombinante da DSG1 (LIN e cols., 2000). A resposta dos clones de células T a

DSG1 derivados de 5 pacientes foi bloqueada por anticorpos anti-DR, mas não por anticorpos anti-DQ ou DP, sugerindo que a resposta específica de células T de pacientes com FS à DSG1 é restrita a HLA-DR. Os clones de células T derivados desses pacientes produzem IL-4, IL-5 e IL-6, porém não IFN- γ , indicativo do perfil Th2 de citocinas. O perfil Th2 de citocinas, como por exemplo IL-4, pode modular a resposta de subclasse IgG nesses pacientes. Através da análise do receptor de LT em clones de células T anti-DSG1 de pacientes com PV e PF revelou-se resposta oligoclonal com uso limitado de receptores do linfócito T (MOESTA e cols., 2002; HACKER-FOEGEN e cols., 2003).

Uma investigação dos aspectos imunopatológicos do PF no Brasil, determinou o nível de várias citocinas presentes no soro de pacientes e controles sadios. Foram quantificadas por ELISA as citocinas IL-2, -4, -5, -10, -12 e IFN- γ em ambos os grupos. A concentração média de IL-2 e IL-4, foi menor em pacientes quando comparada aos controles ($P < 0,01$). Essa proporção também foi observada para as citocinas IL-5 e IFN- γ . Já as citocinas IL-10 e IL-12 estão em níveis mais elevados no soro dos pacientes com PF ($P < 0,01$). IL-12 é produzida principalmente por linfócitos B, células de Langerhans e macrófagos e é responsável pela estimulação do perfil de citocinas Th1. Por outro lado, IL-10 tem a função de inibir o perfil Th1. Segundo o estudo, o decréscimo dos níveis das citocinas IL-2 e IFN- γ no PF, podem ser causados pela inibição do perfil Th1. A IL-10 encontra-se aumentada no PF, provavelmente, devido ao estímulo da proliferação de LB, sendo assim responsável pela ampla produção de autoanticorpos e inibição de Th1. O aumento no número de LB seria então responsável pelo aumento de IL-12 no PF, que poderia interferir na resposta imune do tipo Th2, explicando assim os baixos níveis de IL-4 e IL-5 encontrados nos pacientes. Esse fato poderia estimular a resposta do tipo Th1, porém esta encontrou-se inibida nesse estudo, mostrando assim um predomínio do perfil Th2 em PF. Não foi encontrada associação entre diferentes níveis de citocinas e as formas localizada e generalizada de PF (ZEOTI e cols., 2000).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que células T específicas para as desmogleínas são necessárias para a ativação de LB autorreativos. Células B autorreativas à DSG3 ativadas produziram anticorpos quando linfócitos T periféricos de pacientes com PV foram estimulados com DSG3. A depleção de células T CD4+ ou adição de anticorpos anti-DR/DQ aboliram essa resposta, sugerindo que a interação

molécula CPH/células T seja crítica para a ativação de LB reativos a DSG3 e secreção de anticorpos. Evidências *in vivo* mostrando o papel crítico de células T desmogleína-específicas na ativação de linfócitos B foram mostradas por pesquisadores estudando um modelo murino de pênfigo, primeiramente descrito por AMAGAI e cols. (2000). Nesse modelo, esplenócitos de camundongos Dsg3 ^{-/-} imunizados com DSG3 são transferidos em camundongos imunodeficientes Rag2 ^{-/-}, restaurando o quadro de lesões orais e acantólise suprabasal encontrada no PV (AMAGAI e cols., 2000). TSUNODA e cols. (2002) mostraram que os anticorpos anti-DSG3 patogênicos são somente produzidos em camundongos receptores Rag2 ^{-/-} quando ambas as frações de LT e LB são transferidas.

A tolerância periférica pode ocorrer através da supressão ativa por células reguladoras. Diferentes tipos de células reguladoras já foram descritos, incluindo células T CD4⁺ CD25⁺ (Treg) que expressam constitutivamente as moléculas CTLA-4, GITR e Foxp3 (FONTENOT e cols., 2003), as células Th3 produtoras de TGF-beta, células Tr1 produtoras de IL-10 e células T CD8⁺CD28⁻ (MALOY e cols., 2001). As células T supressoras foram primeiramente descritas no início dos anos 70, mas pouco se sabia a respeito de suas características fenotípicas e mecanismo de ação. A descoberta de que a transferência de uma população de células T depletadas da molécula CD25⁺ induzia doenças autoimunes órgão-específicas em modelos murinos imunodeficientes, reascendeu a busca por células com função reguladora da resposta imune (SAKAGUCHI e cols., 2001). As células T CD4⁺CD25⁺ são células T reguladoras (Treg) e foram inicialmente descritas como derivadas do timo, mas também podem ser geradas na periferia (SAKAGUCHI, 2004). Em adição às células Treg CD25⁺, há também aquelas células Treg do tipo 1 (Tr1) induzidas por antígenos (SAKAGUCHI, 2005). Células Tr1 secretam IL-10 e TGF-β, citocinas que são conhecidas por serem imunossupressoras e críticas para a manutenção da tolerância às células T. Ambos os tipos de células Treg parecem estar envolvidas no PV. Estudos mostraram que as células CD4⁺CD25^{hi} estão marcadamente reduzidas no sangue periférico de pacientes com PV quando comparadas a controles sadios (SUGIYAMA e cols., 2007). Estudos recentes também mostraram que células Tr1 DSG3-específicas secretoras de IL-10 estão presentes na maioria dos controles sadios, porém em menos de 20% dos pacientes com PV, sugerindo que a perda de função das células T reguladoras pode desempenhar papel no desenvolvimento da

doença (VELDMAN e cols., 2004a). Essas células Tr1 DSG3-específicas inibem a ativação de LT CD4+ Th1 e Th2 através da secreção de IL-10 e TGF- β , e expressão de Foxp3, um fator de repressão transcricional conhecido por ter importante papel na regulação do desenvolvimento e função das células T (VELDMAN e cols., 2006). A inativação de Foxp3 utilizando a tecnologia antisense induz perda fenotípica de marcadores de células Treg DSG3-específicas, seguida por perda funcional. Essas células também desenvolvem resposta proliferativa alta à DSG3 e secretam perfil de citocinas similar ao de células Th2 (VELDMAN e cols., 2006). Dessa forma, as células T reguladoras parecem desempenhar papel crucial na manutenção da tolerância de células T, podendo representar um alvo para novas terapias.

2.2.8 Possíveis mecanismos de patogênese do PF

Dentre as possibilidades descritas para o desenvolvimento de PF, postula-se que essa doença seja dirigida pelo antígeno, a partir de mudanças na sua estrutura, não presentes durante a seleção tímica, levando a falhas na tolerância periférica. Vários estudos indicam que modificações estruturais de peptídeos podem afetar a ligação destes com as moléculas HLA de classe II e também o reconhecimento pelo receptor do linfócito T (RCT) (WUCHERPFENNIG, 2001).

Na doença celíaca, modificações estruturais de peptídeos podem influenciar na resposta mediada por células T. Entre essas modificações, são de particular interesse aquelas que mudam as propriedades de carga de um peptídeo, tais como deaminação da glutamina para ácido glutâmico (ou da asparagina para ácido aspártico), ambas levando a ganho de carga negativa (WUCHERPFENNIG e cols., 1995a).

Estudos realizados com artrite reumatóide (AR) revelaram que os autoanticorpos de caráter autoimune são direcionados contra peptídeos citrulinados, pela deimidação da arginina em citrulina, levando à perda de carga positiva do aminoácido. Anticorpos contra esses peptídeos citrulinados parecem ser específicos para AR, não sendo encontrados em outras doenças reumáticas (SCHELLEKENS e cols., 1998). Essas modificações pós-traducionais podem ocorrer em resíduos do peptídeo que são importantes para o reconhecimento via CPH-RCT. Indivíduos geneticamente susceptíveis podem apresentar moléculas HLA que ligam esses

peptídeos próprios modificados com maior afinidade do que indivíduos com outros genótipos. A compreensão estrutural das moléculas CPH associadas a doenças autoimunes pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que inibam a apresentação desses peptídeos em quadros autoimunes (WUCHERPFENNIG, 2001).

A DSG1, autoantígeno do PF, pode também ter sua estrutura modificada por fatores ambientais e nutricionais. Drogas e alimentos que contenham tiol, compostos fenólicos e tanino podem provocar reações enzimáticas que levam a mudanças estruturais do antígeno-alvo (TUR e cols., 1997; TUR e cols., 1998). Entretanto, em estudos epidemiológicos, não foi observado um risco maior de desenvolver PF entre indivíduos de áreas endêmicas expostos a esses agentes químicos em relação àqueles não expostos aos mesmos (TUR e cols., 1997; TUR e cols., 1998). Outro fator ambiental que poderia contribuir para a modificação da desmogleína é a picada pelo borrachudo da espécie *Simulium nigrimanum*, através da infecção local da epiderme promovida pela entrada de bactérias após a picada. Esta infecção levaria a formação de peptídeos capazes de induzir autoimunidade, ou seja, neo-antígenos não apresentados anteriormente durante a seleção tímica.

Pesquisadores encontraram formas de processamento alternativo do mRNA do gene *DSG1*. Durante esse estudo, foi observado que o mRNA extraído de queratinócitos de 14 pacientes com PF possuía uma inserção de 101 pares de bases na extremidade 3' do íntron 6, que ocasionava um códon de término prematuro. Sendo assim, nem todas as formas da proteína DSG1 podem ser apresentadas aos linfócitos T durante a seleção tímica, podendo se ligar preferencialmente às moléculas HLA de susceptibilidade e, dessa maneira, estimulariam mais eficientemente os clones de células T presentes na periferia (MARTEL e cols., 2001).

Além de modificações estruturais da DSG1, outro mecanismo proposto para a patogênese do PF é a reatividade cruzada ou mimetismo molecular com antígenos exógenos. Postula-se que no momento da picada pelo *Simulium nigrimanum*, poderia ocorrer a contaminação do hospedeiro com substâncias antigênicas componentes da saliva deste mosquito, bem como bactérias e/ou vírus que possam estar presentes na saliva do inseto (DIAZ e cols., 1989b; LOMBARDI e cols., 1992). Este mimetismo poderia levar a um distúrbio no equilíbrio entre a tolerância e auto-

reatividade das células T e desencadear um processo autoimune, levando à produção de anticorpos autorreativos contra DSG1.

LI e cols. (2003) mostraram a relação entre o espalhamento intramolecular de epítomos e a manifestação clínica de PF em uma comunidade indígena brasileira (reserva de Limão Verde, MS), com altos índices de incidência e prevalência da doença. A partir da observação de que tanto pacientes com PF e pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos e indivíduos sadios possuem anticorpos contra epítomos do quinto domínio extracelular da DSG1 (EC5), e que pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos e indivíduos sadios não apresentam lesões epidérmicas, foi proposto um modelo imunopatogênico para o PF. Primeiramente, a produção de anticorpos anti-EC5 seria desencadeada por reação cruzada de antígenos exógenos que apresentam homologia de sequência com o domínio EC5 de DSG1. Pacientes com PF em estágios pré-clínicos, indivíduos sadios e os demais pacientes com oncocercose, doença de Chagas e leishmaniose, desenvolveriam uma resposta humoral (IgG1 e IgG4) inicial não-patogênica contra o domínio EC5, a partir do contato com o fator ambiental. Este domínio possui tamanho reduzido e está localizado próximo a membrana, podendo ser críptico, ou seja, seqüestrado *in vivo*, sendo incapaz de ser ligado por anticorpos anti-EC5 circulantes. Em um segundo estágio, indivíduos geneticamente susceptíveis desenvolveriam a manifestação clínica do PF, através de um fenômeno denominado espalhamento intramolecular de epítomos, produzindo anticorpos patogênicos (IgG4) contra o primeiro (EC1) e o segundo (EC2) domínios (amino-terminais) extracelulares da DSG1 (Figura 5). Estes domínios estão envolvidos na atividade de adesão promovida pela desmogleína e sua ligação a anticorpos interfere na função da glicoproteína. Pacientes em fase de remissão da doença apresentam apenas anticorpos contra o domínio EC5, evidenciando dessa maneira, que o espalhamento intramolecular de epítomos pode modular estágios de remissão e recaída do PF.

Outra hipótese seria que os alelos HLA de resistência, tais como *HLA-DRB1*0301*, **0701*, **0801*, **1101*, **1104* e **1402* estariam envolvidos na proteção ao PF (LOMBARDI e cols., 1992; PAVONI e cols., 2003). Essa proteção seria dada através da deleção de células T autorreativas durante a maturação tímica, que poderia não ocorrer se o auto-peptídeo se ligasse a uma molécula HLA de baixa

afinidade. Essas últimas seriam moléculas HLA associadas a uma maior susceptibilidade ao PF (ROSMALLEN e cols., 2002). Indivíduos portadores de genótipos apenas com alelos *HLA-DRB1* de susceptibilidade, ou ainda aqueles com um alelo de *HLA-DRB1* de susceptibilidade e outro neutro, não teriam a supressão das células T auto-reativas na periferia ou a própria deleção no timo, como poderia ser o esperado para aqueles indivíduos que apresentassem pelo menos um alelo de proteção em seu genótipo. PAVONI e cols. (2003) demonstraram, em seus estudos, um efeito dominante dos alelos *HLA-DRB1* de proteção e sugeriram que estes poderiam codificar moléculas HLA que apresentassem peptídeos de maior afinidade para os RCTs dos clones reativos, levando a supressão ou deleção destes linfócitos.

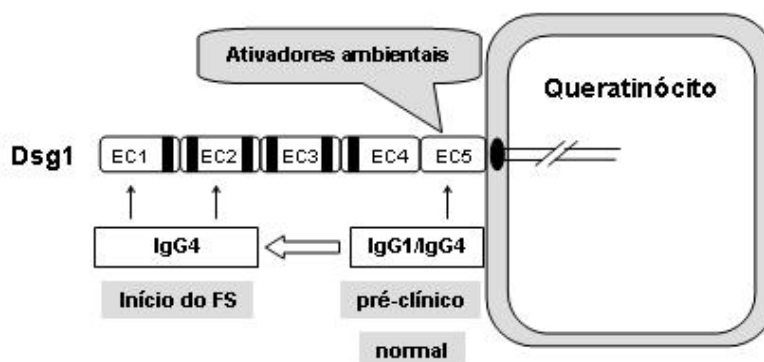
As moléculas HLA codificadas pelos alelos de resistência poderiam, também, estar ativando células T reguladoras, ou seja, supressoras antígeno-específicas, inibindo, desta forma, a resposta imune dos linfócitos T autorreativos efetores. A ativação de células T supressoras não ocorre se sinais co-estimuladores forem reprimidos, pois essa transdução de sinal depende das moléculas CD80 e CD86 presentes nas células apresentadoras de antígeno. Alterações dessas vias de sinalização podem interferir na resposta imune (CRISPIN e cols., 2004).

Além dessas hipóteses, deficiências no mecanismo de apoptose podem contribuir para o início de uma doença autoimune através da falha da seleção negativa de linfócitos autorreativos. O número de células no sistema imune é controlado através do equilíbrio entre mitose e apoptose, sendo regulado por fatores de crescimento, hormônios e citocinas, durante cada estágio do desenvolvimento do sistema imune (VAUX e cols., 2000). Linfócitos que falharam ao rearranjar seus receptores antigênicos são eliminados. O mesmo ocorre com timócitos que falharam no reconhecimento ao CPH próprio (seleção positiva), ou que reconheceram fortemente antígenos próprios (seleção negativa) (NOSSAL, 1994). A apoptose também é importante na eliminação das células efectoras após o término da resposta imune.

Portanto, acredita-se que o mimetismo antigênico, iniciado por estímulos ambientais, é o possível mecanismo desencadeador do PF. Na sequência, há a geração de autoanticorpos não patogênicos contra o quinto ectodomínio extracelular da DSG1 (EC5). Em indivíduos geneticamente predispostos ocorre a geração de autoanticorpos patogênicos contra o primeiro e segundo ectodomínios da DSG1

(EC1 e EC2), através do espalhamento intramolecular de epítomos. Estudos anteriores mostraram que linhagens celulares e clones de LT CD4⁺ derivados do sangue periférico de pacientes com pênfigo foliáceo possuem resposta proliferativa aos ectodomínios da proteína recombinante da desmogleína 1. Essa resposta é restrita à apresentação de peptídeos por moléculas HLA-DR e promove a secreção de citocinas do tipo Th2 que estimulam a produção de autoanticorpos por LB autorreativos. Porém, até o presente momento, nenhum peptídeo imunodominante dos ectodomínios da DSG1 envolvidos com a patogênese do PF foi identificado.

FIGURA 5 – MODELO PARA A VIA IMUNOPATOGÊNICA DE PF



LEGENDA: Um modelo de via imunopatogênica de PF. Fatores ambientais desencadeiam a produção de anticorpos não patogênicos do tipo IgG1 e IgG4 contra o quinto domínio extracelular (EC5) da proteína DSG1. Em indivíduos geneticamente predispostos, o espalhamento intramolecular de epítomos resulta na geração de anticorpos predominantemente do tipo IgG4 contra os primeiro (EC1) e segundo (EC2) ectodomínios de DSG1, levando à indução de PF.

FONTE: modificado de LI e cols. (2003)

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

✓ Objetivo geral:

Mapear os epítomos imunodominantes da proteína desmogleína 1 (DSG1) e relacionar com genótipos do gene *HLA-DRB1* associados a susceptibilidade/resistência ao PF

✓ Objetivos específicos:

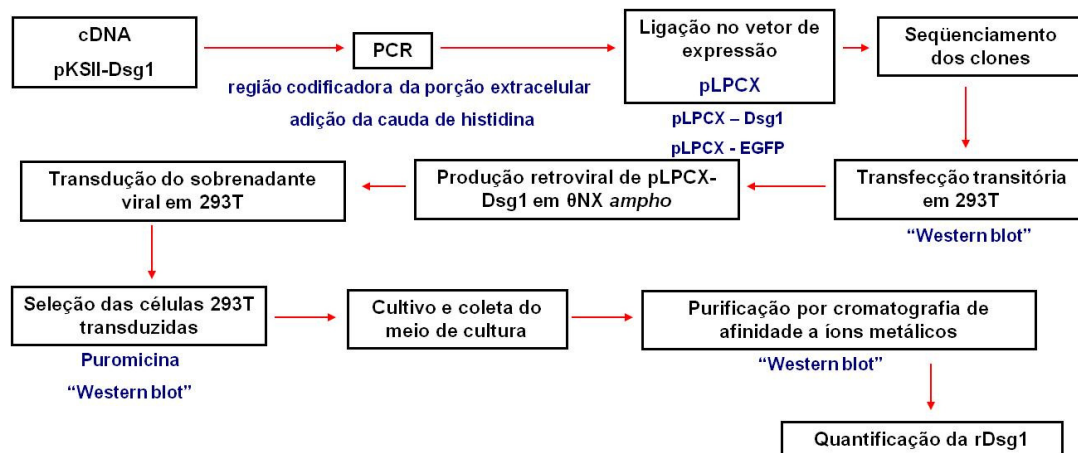
- Expressar a porção extracelular da proteína DSG1 (proteína recombinante da desmogleína 1 – rDSG1).
- Avaliar o padrão de reconhecimento da proteína DSG1 e dos peptídeos EC1, EC2 e EC5 por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com Pênfigo Foliáceo e indivíduos saudáveis, através de ensaio de proliferação.
- Avaliar o padrão de reconhecimento da proteína DSG1 e dos peptídeos EC1, EC2 e EC5 por linhagens de linfócitos provenientes de biópsia de pele de pacientes com Pênfigo Foliáceo.
- Estabelecer clones de CMSP e de linhagens de linfócitos de biópsia de pele e analisar a capacidade de reconhecimento desses clones frente aos mesmos peptídeos e proteína DSG1 acima descritos.
- Analisar a resposta humoral de IgG total contra DSG1 e peptídeos EC1, EC2 e EC5 pelo método de ELISA.
- Relacionar as respostas celular e humoral à proteína recombinante da DSG1 e peptídeos sintéticos com os alelos *HLA-DRB1* associados ao Pênfigo Foliáceo.

O mapeamento de epítomos imunodominantes da proteína desmogleína 1 e uma melhor caracterização da interação entre diferentes genótipos *HLA-DRB1* apresentando diferentes epítomos do autoantígeno, contribuirá para uma melhor compreensão da etiopatogênese do PF.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PORÇÃO EXTRACELULAR DA DESMOGLEÍNA 1

A clonagem do fragmento gênico que codifica a porção extracelular da proteína desmogleína 1 (DSG1) foi realizada seguindo as etapas mostradas no diagrama abaixo:



4.1.1 Obtenção do cDNA

O cDNA correspondente à porção codificadora da DSG1 foi fornecido pela pesquisadora Kathleen J. Green, do Departamento de Patologia e Centro de Câncer, da Escola Médica da Universidade do Noroeste, Chicago, EUA.

O cDNA da DSG1 foi identificado a partir da biblioteca de expressão λ gt11 de prepúcio humano gerada pela *Clontech* (Palo Alto, EUA) (GREEN e cols., 1988). A região codificadora do gene *DSG1* foi clonada em vetores de clonagem *Bluescript* (Stratagene - La Jolla, EUA) e ambas as fitas de DNA foram inteiramente seqüenciadas pelo método de terminação de cadeia dideoxi de Sanger (SAMBROOK e cols., 1989). Os plasmídeos foram então purificados por *mini* ou *maxipreps*, utilizando o procedimento de lise alcalina (SAMBROOK e cols., 1989) e submetidos à análise computacional, *northern* and *southern blotting* (SAMBROOK e cols., 1989).

Dois plasmídeos, pKSII 536 e pKSII 812, contendo a região codificadora da

desmogleína 1 clonada entre os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind* III do vetor pKS II, foram gentilmente cedidos para esse projeto de doutorado. O plasmídeo pKSII 812 encontra-se acrescido de uma etiqueta FLAG (octapeptídeo NH₃-**DYKDDDDK**-COOH), que permite a purificação por cromatografia de afinidade.

4.1.2 Transformação por choque térmico e extração dos plasmídeos pKSII p536 e p812

Os cDNAs enviados em papel filtro, foram eluídos em 50 µl de tampão TE (10 mM Tris·Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA) e conservados a 4°C durante um dia, sendo em seguida estocados a -80°C.

A transformação foi realizada em bactéria *Escherichia coli* XL1-Blue quimiocompetente. Quatrocentas nanogramas dos plasmídeos pKSII p536 e pKSII 812 foram transferidos para tubos de 1,5 ml. A esse volume foram adicionados 100 µl da bactéria. Após homogeneização, as alíquotas foram colocadas em banho de gelo por 20 minutos. Após esse período, as bactérias foram submetidas a choque térmico a 42°C por 1 minuto e trinta segundos e então novamente colocadas em banho de gelo por 3 minutos.

Após a transformação, foram adicionados 200 µl de meio Luria Broth Base (LB) líquido aos tubos, e as bactérias foram incubadas sob agitação constante (250 rpm) por 1 hora a 37°C. Na sequência, cada amostra (300 µl) foi plaqueada em uma placa de LB ágar contendo 200 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich, EUA), para o crescimento e seleção de bactérias transformantes que contivessem o plasmídeo inteiro. As placas permaneceram em estufa, por 18 horas a 37°C.

4.1.3 Extração do DNA plasmidial em média escala

Em seguida, uma colônia transformante contendo cada um dos plasmídeos foi inoculado em meio LB contendo 200 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich, EUA) por 18h, a 37°C, sob agitação constante a 250 rpm.

Transcorrido esse tempo, 0,5 ml de ambos os pré-inóculos foram adicionados a 150 ml de meio LB 200 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich, EUA), que permaneceu sob agitação constante (250 rpm), a 37°C por 18 horas novamente.

Na sequência, foi realizada a extração do DNA plasmidial com o uso do kit *QIAGEN plasmid MIDI Kit*. A extração por esse kit baseia-se na lise alcalina das bactérias seguida da purificação do DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica. Proteínas, RNA, metabólitos e demais moléculas de impureza de baixo peso molecular são removidas por lavagens em tampão contendo 1M de NaCl. Na sequência, o DNA plasmidial ultra-puro é eluído com um tampão contendo alta concentração salina (NaCl 1,6M), sendo concentrado e desalinizado através da precipitação com isopropanol. Em seguida, o precipitado é coletado por centrifugação, ressuspenso em tampão TE e quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda (λ) de 260 nanômetros (nm).

4.1.4 Clonagem da região codificadora da DSG1 no vetor de expressão pLPCX

Uma vez optado pelo sistema que utiliza células de mamífero para a expressão gênica, o vetor de expressão pLPCX (Clontech - Palo Alto, EUA) foi escolhido para a clonagem do cDNA de DSG1. Esse vetor contém elementos derivados do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV) e do vírus do sarcoma murino de Moloney (MoMuSV), sendo indicado para entrega gênica retroviral para a expressão gênica em células de mamífero. Em transfecções em uma linhagem celular empacotadora, pLPCX expressa de forma transitória ou estável (integrada ao DNA genômico), um transcrito contendo o sinal de empacotamento viral (ψ^+), o gene de resistência a puromicina (*Puro^r*) e o gene de interesse. O LTR 5' (*Long Terminal Repeat 5'*) viral contém sequências promotoras e *enhancers* que controlam a expressão da puromicina fosfotransferase para a seleção de células transformadas pelo antibiótico puromicina. O gene de interesse pode ser clonado no sítio de clonagem múltipla, à jusante do promotor imediatamente precoce do Citomegalovírus humano ($P_{CMV\ IE}$). Esse vetor também possui a origem de replicação (Col E₁) e o gene de resistência a ampicilina (*Amp^r*) para a sua propagação e crescimento.

4.1.4.1 Obtenção da região codificadora da porção extracelular da DSG1 para clonagem no vetor pLPCX

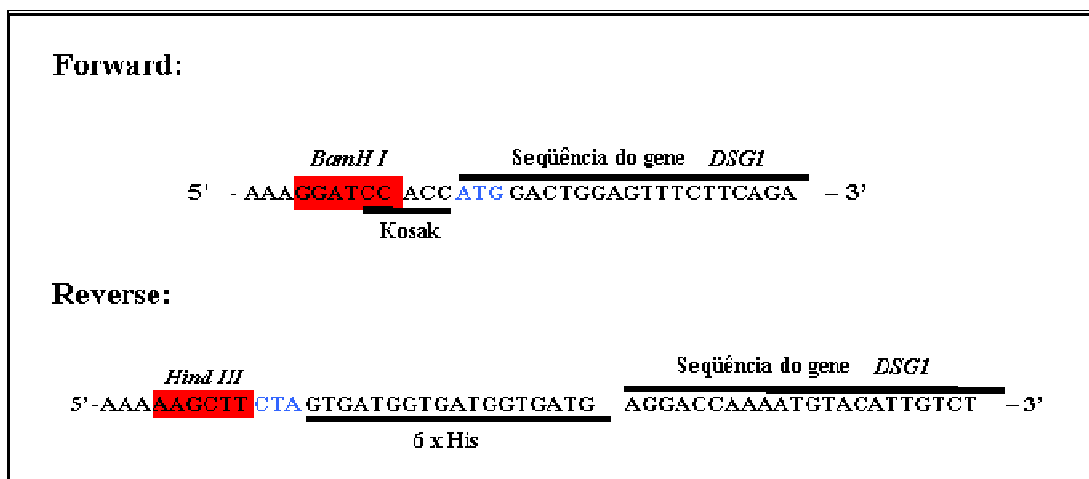
Como a DSG1 é uma glicoproteína de membrana e os autoanticorpos no PF são direcionados contra o primeiro, segundo e quinto ectodomínios extracelulares,

optou-se pela expressão da porção extracelular dessa proteína. Para a amplificação da região codificadora da porção extracelular de DSG1 e sua inserção no vetor pLPCX, foram desenhados oligonucleotídeos para sua obtenção por PCR (Figura 6). Além disso, os oligonucleotídeos foram projetados de forma que introduzissem sítios de restrição *BamH* I e *Hind* III na porção de interesse do cDNA, juntamente com a sequência *Kosak* (sequência de ligação ao ribossomo), códons de início e término (logo após ao término da sequência de nucleotídeos correspondente a porção extracelular) e cauda de histidina (para posterior purificação da proteína por cromatografia de afinidade).

O protocolo de amplificação do cDNA está descrito na Tabela 3. A análise da PCR foi realizada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e brometo de etídeo (0,5 µg/ml), para verificação do tamanho do produto amplificado. A voltagem utilizada foi de, aproximadamente, 120V/cm². Uma alíquota de 4µl do produto de PCR juntamente com 2µl de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol, 40% p/v de sucrose em água destilada) foi aplicada em gel. Após 1 hora e 45 minutos de corrida, as bandas foram visualizadas à luz ultravioleta e registradas através de fotodocumentação. O fragmento de DNA amplificado correspondente à região codificadora da porção extracelular da DSG1 possui tamanho de 1644 pb.

Antes da digestão do fragmento correspondente a porção extracelular da DSG1 para ligação ao vetor pLPCX, realizou-se a purificação do produto de PCR, retirando assim excessos da enzima DNA polimerase e demais reagentes. Essa purificação foi realizada com o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, EUA). Esse método de purificação utiliza um agente caotrópico que desnatura proteínas, dissolve agarose e promove a ligação do DNA dupla-fita (dsDNA), 100pb a 48kb, a uma matriz de fibra de vidro presente na coluna de purificação. Uma vez que o DNA é capturado, contaminantes como proteínas e sais são lavados e eliminados com o uso do tampão de lavagem, e o dsDNA purificado é eluído em tampão TE ou água ultra-pura, podendo ser eluído em volume menor que o inicial, caso haja necessidade de concentração da amostra. Em seguida fez-se a quantificação do material extraído por espectometria.

FIGURA 6 – ESQUEMA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA INSERÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO E HIS-TAG NO CDNA DE DSG1



LEGENDA: Oligonucleotídeo-iniciador forward: direto ou a montante; reverse: reverso ou a jusante. Em vermelho: sítios de clivagem das enzimas de restrição *BamHI* e *Hind III*, para posterior corte do produto de PCR e inserção no vetor de expressão pLPCX. Em azul: códons de início (ATG) e término de tradução (CTA). Sequência Kosak: sequência de ligação do mRNA ao ribossomo, para tradução. Cauda de histidina (6xHis): para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

FONTE: o autor (2009)

TABELA 3 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NA PCR PARA OBTENÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DA DSG1 PARA CLONAGEM NO VETOR pLPCX

REAGENTE	QUANTIDADE
Quantidade de DNA plasmidial	200 ng
Tampão high fidelity 10 X (Eppendorf, ALE)	1X – 2,5 mM MgCl ₂
dNTP	0,2 mM
Oligonucleotídeos iniciadores	5 pmoles
TripleMaster polimerase (Eppendorf, ALE)	2,5 U
Água ultra-pura q. s. p.	50 µl
Ciclagem: temperatura/tempo	
Desnaturação inicial	94°C – 3'
Pré-anelamento	94°C – 30"
	72°C – 4'
Ciclos (n = 41)	
Desnaturação	94°C – 30"
Anelamento	66°C – 30" - 3ciclos
	62°C – 30" - 3 ciclos
	58°C – 30" - 35 ciclos
Alongamento	72°C – 4'
Alongamento final	72°C – 10'
Término da reação	4°C - ∞

FONTE: o autor (2009)

4.1.4.2 Digestão e purificação do vetor pLPCX e da sequência amplificada por PCR da região codificadora da porção extracelular da DSG1

Na sequência, tanto o produto de PCR (inserto) e o vetor pLPCX foram digeridos com enzimas de restrição nas condições descritas na tabela 4, para posterior reação de ligação entre ambos. Na digestão do inserto, foram utilizadas as enzimas de restrição *BamH* I - *Hind* III (Promega, EUA). Já para o vetor, foram utilizadas as enzimas *Bgl* II e *Hind* III (Promega, EUA).

TABELA 4 – PROTOCOLO UTILIZADO NA DIGESTÃO DO VETOR E INSERTO COM AS ENZIMAS *BAMH* I E *HIND* III (rDSG1) E *BGL* II E *HIND* III (PLPCX)

REAGENTE	QUANTIDADE
Produto de PCR/ vetor	5,0 / 2,0 ug
Tampão (Buffer E – Promega , EUA) 10 X	1X
Enzima de restrição (Promega , EUA)	10 U
Água Milli-Q q.s.p.	50 µl
Temperatura/tempo	37°C – 2h

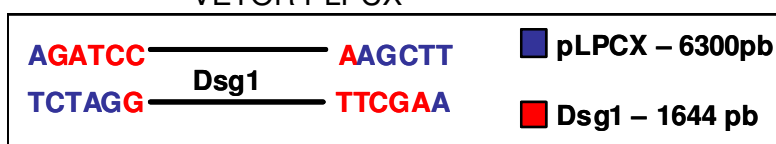
FONTE: o autor (2009)

Para a purificação do material digerido, segundo o protocolo acima, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 2%. A voltagem utilizada foi de, aproximadamente, 100V/cm² por 1 hora e 30 minutos. Para evitar a exposição do inserto e do vetor ao brometo de etídeo e à irradiação com luz ultra-violeta, duas alíquotas de cada amostra foram corridas em canaletas separadas. Ao final da corrida eletroforética, as canaletas-guia foram recortadas do gel de agarose e coradas com brometo de etídeo (0,5µg/ml), servindo como marcador de posição para que as bandas de interesse fossem recortadas do gel de agarose para a purificação das mesmas. A purificação dos fragmentos de interesse a partir do gel de agarose foi feita através do kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, EUA), conforme reação descrita anteriormente. O vetor foi ainda tratado com fosfatase alcalina (CIAP – *Alkaline Phosphatase, Calf Intestine* – Promega, EUA), que catalisa a hidrólise dos grupamentos fosfato 5' do DNA, impedindo assim a recircularização desse, fato que prejudicaria a reação de ligação. Na sequência, o vetor foi novamente purificado.

4.1.4.3 Ligação do vetor pLPCX e da sequência da região codificadora da porção extracelular da DSG1 e transformação em *E.coli*

Para o procedimento de ligação do inserto no vetor pLPCX (Figura 7), a proporção em nanogramas de inserto/vetor foi de aproximadamente 5:1, deixando o inserto em estado de saturação, fato que favorece a sua ligação ao vetor adicionado. As condições utilizadas para a ligação estão descritas na Tabela 5.

FIGURA 7 – ESQUEMA DE LIGAÇÃO ENTRE DSG1 E O VETOR PLPCX



LEGENDA: Em vermelho: extremidades do produto de PCR referentes à sequência da região codificadora da porção extracelular da DSG1 digerida com as enzimas *BamH* I e *Hind* III; Em azul, as sequências referente as extremidades do vetor pLPCX linearizadas com as enzimas *Bgl* II e *Hind* III, para ligação ao inserto.

FONTE: o autor (2009)

TABELA 5 – PROTOCOLO UTILIZADO NA LIGAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DA DSG1 AO PLASMÍDEO PLPCX

REAGENTE	QUANTIDADE
Tampão 5X (Invitrogen)	1X
Enzima <i>T4 DNA ligase</i> (Invitrogen)	5 U
pLPCX	70 ng
Inserto (DSG1)	350 ng
Água Milli-Q q.s.p.	15 µl
Temperatura/tempo	16°C – 20 h

FONTE: o autor (2009)

Em seguida, transformou-se o produto da ligação em *E.coli* DH5α quimiocompetente, seguida da seleção das colônias recombinantes por ampicilina e extração do DNA plasmidial.

4.1.5 Seqüenciamento dos clones

Para as reações de seqüenciamento, foi utilizado o kit *BigDye terminator v.3ng kit* (Applied Biosystems, EUA), conforme meio reacional descrito na Tabela 6. Foram realizados 40 ciclos nas seguintes condições: 96°C por 10 segundos, 52°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações são mantidas a 4°C ao final da amplificação. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de seqüenciamento estão detalhados na tabela 7.

TABELA 6 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

REAGENTE	QUANTIDADE
Tampão 5X	1X
Oligonucleotídeo iniciador	5 pmoles
BigDye	2 µl
DNA molde	500 ng
Água Milli-Q q.s.p.	20 µl

FONTE: o autor (2009)

TABELA 7 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICADORA DA DSG1 CLONADA NO VETOR pLPCX

Oligonucleotídeo Iniciador	Seqüência de nucleotídeos
pLPCX 5'	CGTGTACGGTGGGAGGTCTA
pLPCX 3'	TTTGGCCGAGGCGGCCGCTTGTCGACA
Dsg1-int5'-1	CCTCCAGTGTTTTCAATGGCTAC
Dsg1-int5'-2	TTCTCAGCTAACTGGATGGCAGTA
Dsg1-int5'-3	CTCGGAGGAAAATACCAAGGAAC
Dsg1-int3'-1	CTTTGAACCTGGACGAAACACTG
Dsg1-int3'-2	CTGGCCGTATTGCTCTCTGTCTA
Dsg1-int3'-3	GCGGTATGTAACCTTGCTGGTTTG

FONTE: o autor (2009)

Após a reação em termociclador, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a remoção de terminadores não-incorporados. A cada tubo de

reação, foram adicionados 20 µl de água ultra-pura e 60 µl de isopropanol. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 15 minutos a TA e em seguida, centrifugadas a 3000 x g, 20°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bordas do tubo enxugadas com papel absorvente. Na sequência, 150 µl de isopropanol 70% foram adicionados a cada tubo, sendo então centrifugados a 3000 x g, 20°C por 10 minutos. Depois os tubos foram secos em estufa a 37°C para a completa evaporação do isopropanol. Os tubos foram envoltos em papel alumínio e estocados a -20°C até o envio para o serviço terceirizado de seqüenciamento, realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, IB-USP. As amostras foram seqüenciadas em seqüenciadores da Applied Biosystems (EUA), modelos: ABI 3100 (16 capilares) e ABI 3700 (4 x 96 capilares).

4.1.6 Transfecção celular transitória

Transfecção consiste em transferir DNA exógeno para dentro da célula após tratamento com agentes que interferem na composição e/ou estrutura da membrana plasmática. Existem dois tipos de transfecção que são utilizados para expressão em sistemas de células de mamíferos: transitória ou estável. Na transfecção transitória, o plasmídeo não se integra ao genoma da célula, e a expressão do gene transfectado pode ser visualizada entre um e quatro dias após a introdução do DNA.

A lipofecção consiste no uso de lipídios catiônicos, ou seja, carregados positivamente (FELGNER e cols., 1987). A interação e formação de complexos com ácidos nucleicos se devem à interação eletrostática entre os grupamentos fosfato carregados negativamente e a superfície positiva dos lipossomos catiônicos. A natureza lipofílica e as cargas positivas dos lipídios fazem com que esses complexos atravessem a membrana plasmática das células, permitindo ao plasmídeo atingir o núcleo, e lá permanecer sob a forma episomal ou integrar-se ao genoma celular e ser expresso do modo estável.

Para o experimento de transfecção transitória, foi utilizada a linhagem celular denominada 293T, que é uma variante da linhagem HEK (*Human Embryonic Kidney*), derivada de células epiteliais renais embrionárias humanas, sendo de fácil crescimento e transfecção eficiente, características que a fazem ser amplamente utilizada na pesquisa em biologia celular. As células 293T contém o *SV40 large T-*

antigen, que permite a replicação episomal dos plasmídeos transfectados que possuam a origem de replicação SV-40.

Para dar início à transfecção transitória, células 293T foram descongeladas e cultivadas por uma semana com meio DMEM 10% SFB. Na sequência, 2×10^6 células foram plaqueadas em placas p60 e permaneceram em estufa a 37°C, com 2% de CO₂, por 24 horas. O plaqueamento em alta densidade foi necessário, uma vez que a lipofectamina é tóxica, provocando morte celular.

Para o procedimento de lipofecção, dois tubos foram preparados, cada um contendo 300 µl de DMEM sem SFB. Ao primeiro tubo, acrescentou-se 5 µg do plasmídeo pLPCX-DSG1 e ao segundo, 20 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, EUA). Em seguida, o conteúdo dos dois tubos foi misturado, incubando-se essa mistura por 20 minutos a TA para a formação dos complexos dos lipídios catiônicos e DNA plasmidial. Transcorrido o tempo de incubação, os 600 µl do complexo de lipofecção foram distribuídos pela placa contendo células 293T, que permaneceu em estufa a 37°C, 2% CO₂, por um intervalo de 3 a 6 horas. Transcorrido esse tempo o meio foi trocado, sendo substituído por 2 ml de DMEM 10% SFB.

4.1.7 Coleta do meio de cultura e extração de proteínas celulares

Após 48 horas de cultivo, o sobrenadante de ambas as transfecções (pLPCX-DSG1 e pLPCX-EGFP) foi coletado e centrifugado a 5000 x g, por 5 minutos, a 4°C, visando eliminar as células mortas presentes no meio. As células foram lavadas com PBS e então desprendidas da placa. Após centrifugação a 4000 x g, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células lisadas com tampão RIPA⁺ (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl, 1% desoxicolato de sódio, 1% NP40, 0,1% SDS) previamente tratado com coquetel inibidor de protease (1X) (Amersham Biosciences, EUA). Após homogeneização, as células lisadas foram incubadas em gelo por 15 minutos e então novamente homogeneizadas com auxílio de uma seringa de insulina.

4.1.8 Western blot

Na sequência, o sobrenadante (32 µl) e lisado celular (50 µg de proteínas

totais) foi aplicado em gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) 10%, juntamente com 8 µl de tampão de amostra 5X (150 mM Tris-HCl pH=6,8, 6% SDS, 30% glicerol, 15% β-mercaptoetanol, 0,5% azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada em 2 etapas: 130V/20 mA para o gel de empilhamento e 130V/40mA para o gel de corrida. Como padrão de peso molecular, foi utilizado 5 µl do marcador *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen, EUA), que consiste de 10 proteínas com peso molecular entre 10 e 190 kDa.

Para realizar a análise de expressão gênica por *Western Blot* após a corrida, foi realizada a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose carregada positivamente (*Hybond ECL* - Amersham Biosciences, EUA). Espumas, membrana e papéis 3MM foram embebidos em tampão de transferência e então montados no cassete na seguinte ordem (pólo negativo para o pólo positivo): espuma, 3 pedaços de papel 3MM, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose, 3 pedaços de papel 3MM e mais uma espuma. As bolhas de ar foram retiradas, o cassete fechado e colocado na cuba de eletroforese com tampão de transferência. A transferência foi realizada por 2 horas a 100V/200mA, tomando o cuidado de manter a cuba de eletroforese em banho de gelo, devido a alta voltagem/amperagem aplicadas.

Transcorrido esse tempo, a membrana foi corada com 0,1% Ponceau em 10% de ácido acético por alguns minutos, para checar a presença de proteínas. Após lavagem com TBS 1X - 0,1% Tween para descorar a membrana, esta foi incubada por 1 hora com 5% de leite em pó diluído em TBS 1X-0,1%Tween. Transcorrido esse tempo, a solução foi descartada e a membrana permaneceu incubando durante a noite com o anticorpo anti-His policlonal de coelho (Cell Signalling Technologies, EUA) 1:500, em 4 ml de TBS 1X - 0,1% Tween 5% leite, a 4°C, sob agitação constante.

Na sequência, a membrana foi lavada 6 vezes com TBS 1X - 0,1% Tween, por 5 minutos a TA, e incubada por uma hora com o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho marcado com HRP (do inglês: *horse radish peroxidase* - peroxidase de raiz forte; Pierce-EUA). Transcorrido esse tempo, a membrana foi lavada 4 vezes com TBS 1X - 0,1% Tween e 2 vezes com TBS 1X, por 5 minutos, a TA.

Para revelação, foi utilizado o kit *Amersham™ ECL Plus Western Blotting*

Detection (GE Healthcare Life Sciences, EUA), o qual emite quimioluminescência e quimiofluorescência. Dessa forma, a reação pode ser analisada em filme de raio X ou *scanners* a laser. Nessa etapa, o *Western Blotting* foi analisado através do *scanner* STORM™ (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

4.1.9 Produção retroviral de pLPCX-DSG1 em linhagem celular Phoenix amphi

O sistema *Phoenix* – vetor MoMuLV, é baseado no vírus da leucemia murina Moloney (MoMuLV) e permite inserir genes na maioria dos tipos celulares em divisão. Esse sistema pode ser subdividido em dois: (i) sistema de empacotamento retroviral ecotrópico (vírus capazes de entregar genes apenas em células murinas e de rato em divisão celular) e anfotrópico (vírus capazes de entregar genes em células em divisão da maioria das espécies de mamíferos, incluindo células humanas) (NOLAN LAB, 2009).

Como vimos anteriormente, o vetor de expressão pLPCX possui sinal de empacotamento viral (ψ^+) em *cis*, porém as sequências *gag*, *env* e *pol* necessárias para transcrição e empacotamento retroviral foram excisadas do vetor, dando espaço para clonagem do gene de interesse. Dessa forma, esses genes estão presentes em *trans*, no genoma da linhagem celular empacotadora. O gene *gag* codifica uma poliproteína, que quando processada, produz várias proteínas importantes para o cerne retroviral. Já o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, RNase H e outras enzimas com função de integrase. Por último, o gene *env* é responsável por codificar as proteínas do envelope, determinando também o tropismo viral.

No presente trabalho, a linhagem *Phoenix amphi* (θNX amphi) foi utilizada para empacotar e secretar o retrovírus contendo o gene de interesse. As linhagens *Phoenix amphi* originaram-se a partir da introdução de sequências de DNA em células 293T para que possam expressar os genes *gag*, *env* e *pol* necessários para o empacotamento e secreção do retrovírus.

Da mesma forma que para a transfecção transitória em 293T, células θNX *amphi* foram descongeladas e cultivadas por uma semana com meio DMEM 10% SFB. Na sequência, 2×10^6 células foram plaqueadas em placas p60, com meio DMEM 10% SFB (Highclone-EUA), permanecendo em estufa a 37°C, com 2% de

CO₂, por 24 horas. O procedimento de lipofecção foi o mesmo descrito anteriormente, utilizando os plasmídeos pLPCX-DSG1 e pLPCX-EGFP em transfecções paralelas.

Foram realizadas coletas do sobrenadante viral nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Após centrifugação a 4000 x g, por 5 minutos, para eliminação de células mortas, o sobrenadante viral foi estocado a -70°C, com exceção da coleta de 48 horas, a qual foi imediatamente transduzida em células 293T.

Cabe salientar, ainda, que a eficiência da transfecção em *θNX amphi* foi confirmada em microscópio de fluorescência, a partir da expressão em paralelo do gene *EGFP*.

4.1.10 Transdução do sobrenadante viral em 293T

Para a produção de linhagens que expressem rDSG1 de modo estável, células 293T foram transduzidas com o retrovírus contendo o gene de interesse, que através do mecanismo de transcrição reversa e integração ao genoma da célula hospedeira, passam a expressar e secretar a proteína recombinante.

Para o experimento de transdução, 2×10^4 células 293T foram plaqueadas em placas de 48 poços. Sobre as células foi adicionado o sobrenadante viral (coleta de 48 horas – vírus fresco), em três volumes diferentes: 5, 50 e 250 µl, completando com meio DMEM 10% SFB até o volume de 250 µl. Após 48 horas, as células transduzidas com o sobrenadante viral de pLPCX-EGFP foram analisadas em microscópio de fluorescência. Devido à baixa quantidade de células fluorescentes, houve a necessidade de re-transdução. Para isso, 2×10^4 células transduzidas com 250 µl de sobrenadante viral foram re-plaqueadas, adicionando sobre os poços 250 µl de sobrenadante viral congelado (coleta de 48 horas), juntamente com 10 µg/ml de polibreno (Sigma Aldrich, EUA). Esse polímero catiônico é utilizado para aumentar a eficiência de transfecção de linhagens celulares por retrovírus, uma vez que age neutralizando a repulsão de cargas entre o vírus e o ácido siálico. Após 48 horas, as células re-transduzidas com o sobrenadante viral de pLPCX-EGFP congelado (coleta de 48 horas) foram observadas em microscópio de fluorescência e a eficiência da transdução, comprovada.

4.1.11 Seleção das células 293T transduzidas

Comparando visualmente o número total de células (luz visível) em relação ao número de células expressando de maneira estável o gene EGFP (fluorescência) no campo fotografado e mostrado na figura anterior, percebeu-se a necessidade de realizar seleção com antibiótico para enriquecer a cultura com células 293T contendo o plasmídeo (pLPCX-DSG1 ou pLPCX-EGFP) integrado no seu genoma. Essa seleção foi realizada com puromicina (Sigma Aldrich, EUA). Para isso, 1×10^5 células da transdução descrita no tópico anterior foram plaqueadas em placas p6 e tratadas com antibiótico diluído em DMEM 10% SFB, nas concentrações de 1 ug/ml, 2 ug/ml e 4 ug/ml, por dois dias.

4.1.12 Cultura de populações estáveis expressando rDSG1 e coleta de sobrenadante

A população de células 293T pLPCX-DSG1 selecionada com 2 ug/ml de puromicina, foi cultivada com meio DMEM 10% SFB. A cada sub-cultivo das células, o meio de cultura foi coletado, centrifugado a $4000 \times g$ por 5 minutos, a 4°C , e armazenado a -70°C . Na sequência, as células foram lavadas com 5 ml de PBSA estéril, e após remoção desse por aspiração, tripsinizadas com 1 ml de tripsina (Gibco- EUA). Adicionou-se 5 ml de meio DMEM 10% SFB, dividindo o conteúdo em 2 garrafas médias (150 cm^2), completando o volume para 20 ml. Esse procedimento foi realizado a cada dois dias, para coleta da proteína secretada.

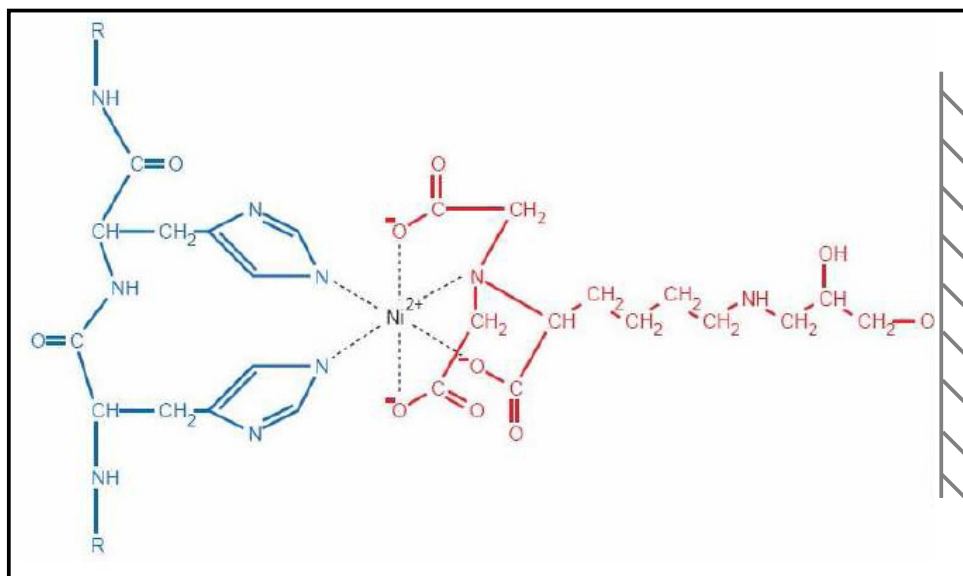
4.1.13 Purificação da desmogleína 1 recombinante (rDSG1)

A purificação de proteínas recombinantes associadas à cauda de histidina pode ser realizada através de cromatografia de afinidade a íons metálicos. A afinidade dos resíduos de histidina ao níquel permite a separação cromatográfica de proteínas recombinantes.

Para a purificação da DSG1 recombinante, foi utilizada a agarose Ni-NTA (Invitrogen, EUA). Essa resina possui ácido nitriloacético (NTA) altamente interligado a sua matriz (agarose 6%). O ácido nitriloacético é um adsorvente tetradentado de propriedade quelante que, ao ser complexado com o metal níquel (Ni^{2+}), ocupa 4 dos

6 sítios de ligação desse, deixando dois sítios livres para interação com os resíduos de histidina ligados à proteína recombinante (Figura 8). NTA tem capacidade de se ligar a metais ionizados de forma estável, retendo a ligação mesmo sob condições de forte estringência (QIAGEN, 2003).

FIGURA 8 – LIGAÇÃO QUÍMICA ENTRE NI-NTA E 6XHIS



LEGENDA: Estrutura molecular em azul: cauda de histidina; estrutura molecular em vermelho: NTA ligada ao níquel (Ni^{2+}); agarose representada em cinza.

FONTE: Qiagen (2003)

Cerca de 100 ml de meio de cultura contendo a proteína recombinante foi concentrado em colunas Centricon (Amicon, EUA), com poros de 30 kDa, através de centrifugação a 3000 x g. O sobrenadante concentrado (4 ml) foi coletado através da centrifugação da coluna invertida, 1000 x g, por 5 minutos. Para evitar degradação da proteína, todas as etapas foram realizadas a 4°C.

Na sequência, 2 ml de Ni-NTA agarose (Invitrogen, EUA) foram colocados em um tubo de 15 ml e lavados com 10 ml de água ultra-pura, que foi descartada por inversão após centrifugação de 500 x g, por 5 minutos, a 4°C. Essa lavagem foi repetida mais uma vez. Em seguida, a agarose foi equilibrada com 10 ml de tampão de ligação em condições nativas (50 mM H_2PO_4 , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH=8,0), sendo então descartado. O meio de cultura foi adicionado à resina, e o volume do tubo completado para 15 ml com o tampão anterior, permanecendo em agitação constante a 4°C, por 2 horas, para ligação da cauda de histidina da

proteína ao níquel da resina. Desta etapa em diante, todos os sobrenadantes foram armazenados para posterior análise por SDS-PAGE.

Após centrifugação de 500 x g, por 5 minutos, o *flow-through* foi retirado por inversão. Foram feitas 3 lavagens com 10 ml do tampão de lavagem I (50 mM H_2PO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH=8,0) e 3 lavagens com 10 ml do tampão de lavagem II (50 mM H_2PO_4 , 500 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH=8,0).

O processo de eluição foi baseado no aumento da quantidade de imidazol. Esse sal possui grande similaridade química com a histidina, porém apresenta maior afinidade de ligação à agarose Ni-NTA que esta. Foram realizadas 3 eluições com quantidades de imidazol diferentes no tampão de eluição (50 mM H_2PO_4 , 500 mM NaCl, 80 mM / 250 mM / 500 mM Imidazol, pH=8,0). Ao final do processo, todos os eluatos foram reunidos e concentrados em coluna Centricon (Amicon, EUA), com poros de 30 kDa, através de centrifugação a 3000 x g, seguida da troca gradativa de tampão com quantidades decrescentes de imidazol (concentrações dos tampões utilizados durante a purificação), e de lavagens com PBSA (*Phosphate-buffered saline with azida*). Essa troca de tampão foi necessária, uma vez que altas concentrações de imidazol são tóxicas para os linfócitos T durante os ensaios de proliferação celular. Por fim, a proteína recombinante concentrada em PBSA foi filtrada com filtros 0,22 μm para adquirir condições estéreis, aliqüotada e guardada a -70°C .

4.1.14 Quantificação da rDSG1 purificada

O ensaio de Bradford foi utilizado para quantificação da proteína. Esse método envolve a ligação do corante *Comassie Brilliant Blue* G-250 a proteínas (BRADFORD, 1976). Esse corante existe sob três formas: catiônica (vermelha), neutra (verde) e aniônica (azul) (COMPTON e cols., 1985). Sob condições ácidas, o corante tem a forma catiônica duplamente protonada ($A_{\text{max}}=470 \text{ nm}$). Entretanto, ao se ligar a proteínas ele é convertido para a forma estável não protonada azul ($A_{\text{max}}=595 \text{ nm}$) (REISNER e cols., 1975).

O kit utilizado na quantificação foi o da Bio-Rad (EUA), na qual a albumina bovina sérica (BSA) é utilizada para montar a curva padrão de concentração (1, 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{g/ml}$). A rDSG1 foi lida nas diluições 1:10 e 1:20. Todas as amostras foram

feitas em triplicata e a absorbância analisada através de leitor de placas (Bio-Rad, EUA), no comprimento de onda de 595 nanômetros.

Para montar o gráfico correspondente à curva padrão de concentração de BSA, a média da DO das triplicatas para cada concentração da curva padrão foi plotada no eixo Y, sendo os pontos do eixo X compostos pelas concentrações de BSA. Depois, foi determinada a equação geral da reta por regressão linear, e, substituindo-se a DO encontrada para a média das triplicatas da diluição de rDSG1 na variável Y da equação, obteve-se a concentração em $\mu\text{g/ml}$ dada pela variável X.

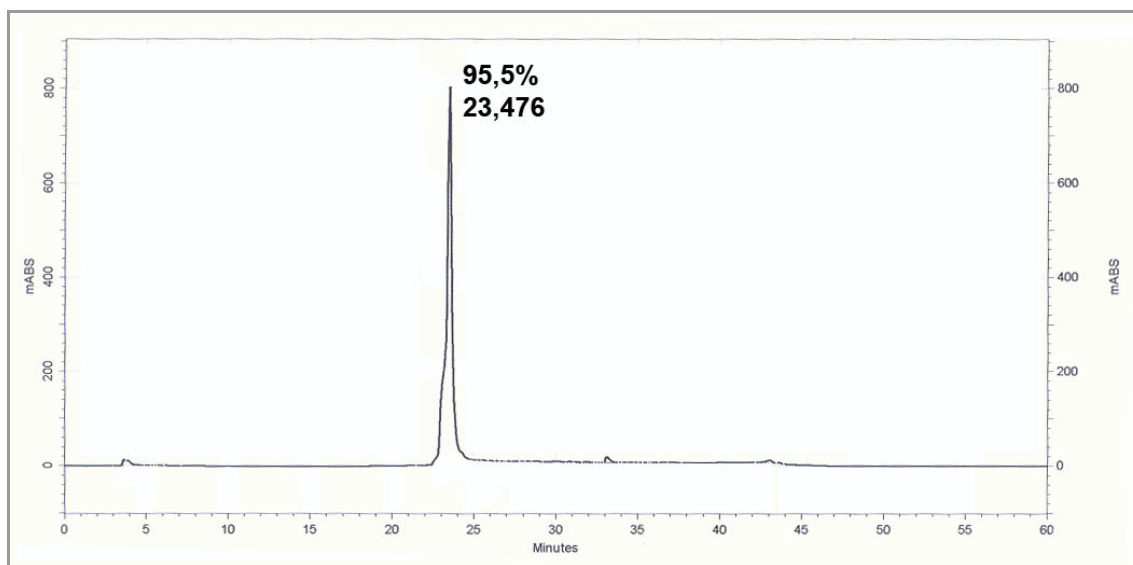
4.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA DSG1

Os peptídeos utilizados nesse trabalho foram sintetizados no Laboratório de Imunologia – Incor. Os peptídeos da proteína desmogleína 1 foram projetados levando em consideração as alças de ancoramento à molécula HLA-DRB1, de acordo com a sequência de aminoácidos disponível no NCBI (NP_001933).

Os peptídeos sintéticos foram sintetizados em fase sólida pelo método Fmoc (ATHERTON e cols., 1989) e ativação *in situ* de aminoácidos através do método HOBt/HBTU, utilizando um sintetizador múltiplo de 8 canais (Shimadzu/Japão, modelo PSSM-8) de acordo com o processo padrão utilizado (STEWART e cols., 1984). Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) (Shimadzu/Japão) e caracterizados por espectrometria de massa modelo TofSpec SE, dotado de tecnologia MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization- Time Of Flight). As figuras 9 e 10 mostram análises por HPLC e espectrometria de massa do peptídeo EC2 (235-258) da proteína DSG1. Os valores dos pesos moleculares (PM) obtidos pela análise de espectrometria de massa dos peptídeos estudados estão na Tabela 8. A maioria dos peptídeos listados possui PM próximo ou igual ao esperado e aqueles que apresentaram PM discordante com o PM teórico foram re-sintetizados. Pequenas diferenças entre PM teóricos e os encontrados durante a síntese dos peptídeos correspondem a moléculas ausentes ou adicionais de hidrogênio (H^+) ou água (H_2O), que não interferem nos testes de proliferação. Para determinação do epítipo mínimo, foram sintetizados peptídeos com sequência homólogas e com aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos, sendo 6 correspondentes ao primeiro ectodomínio (EC1)

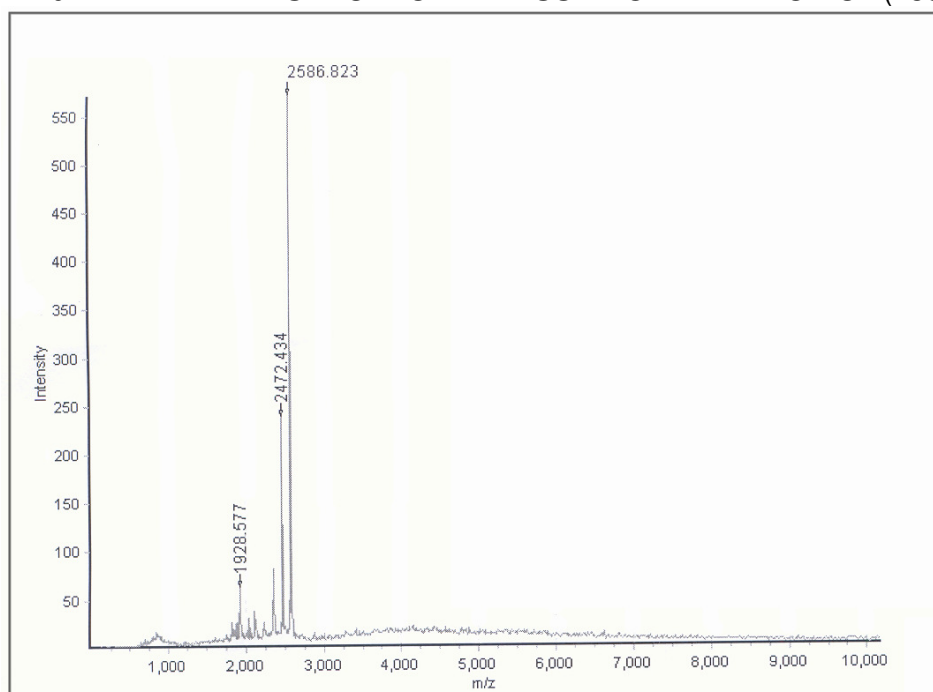
(Figura 11), 5 ao segundo ectodomínio (EC2) (Figura 12) e 3 correspondentes ao quinto ectodomínio (EC5) (Figura 13).

FIGURA 9 – PERFIL DE HPLC DO PEPTÍDEO EC2 (235-258) PURIFICADO



FONTE: o autor (2009)

FIGURA 10 – PERFIL DE ESPECTRO DE MASSA DO PEPTÍDEO EC2 (235-258)



FONTE: o autor (2009)

FIGURA 11 – PEPTÍDEOS DA REGIÃO EC1 DE DSG1

EC1 (50–112)	EWIKFAAACREGEDNSKRNPIAKIHSDCAANQQV TYRISGVGIDQPPYGI FVINQKTGEINIT
Peptídeo	
EC1 (52–72)	IKFAAACREGEDNSKRNPIAK
EC1 (63–83)	DN SKRNPIAKIHSDCAANQQV
EC1 (79–91)	KIHSDCAANQQV TYRISGVG
EC1 (88–105)	SGV GIDQPPYGI FVINQK
EC1 (113–158)	SIVDREVTPFFIIYCRA LNSMGQDLERPLELRVRVLDINDNPPVFS
Peptídeo	
EC1 (125–148)	IYCRA LNSMGQDLERPLELRVRVL
EC1 (141–158)	LELRVRVLDINDNPPVFS

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 12 – PEPTÍDEOS DA REGIÃO EC2 DE DSG1

EC2 (159–218)	MATFAGQIEENS NANTLVMILNATDADEPN NLNSKIAFKIIRQEPSD SPMFIINRNTGEI
Peptídeo	
EC2 (184–206)	ADEPN NLNSKIAFKIIRQEPSDS
EC2 (204–218)	SDSPMFIINRNTGEI
EC2 (216–270)	GEIRTMNNFLDREQYGYALAVRGSDRDGGADGMSAECECN IKILDVNDNIPYME
Peptídeo	
EC2 (216–235)	GEIRTMNNFLDREQYGYAL
EC2 (235–258)	LAVRGSDRDGGADGMSAECECN IK
EC2 (243–258)	DGGADGMSAECECN IK

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 13 – PEPTÍDEOS DA REGIÃO EC5 DE DSG1

EC5 (498–549)	TKITNTNTGRQESTSSTNYDTSTTSTDSSQVYSSEPGNGAKDLLSDNVHFGPA
Peptídeo	
EC5 (499–518)	KITNTNTGRQESTSSTNYDTS
EC5 (524–540)	SSQVYSSEPGNGAKDLL
EC5 (530–549)	SEPGNGAKDLLSDNVHFGPA

FONTE: o autor (2009)

TABELA 8 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA:
PM TEÓRICO E OBTIDO

Peptídeos	PM teórico	PM obtido
EC1 (52-72)	2317,6	2318,6
EC1 (63-83)	2308,5	2307,8
EC1 (72-91)	2145,1	2147,7
EC1 (88-105)	1930,0	1931,5
EC1 (125-148)	2844,4	2848,4
EC1 (141-158)	2094,2	2096,5
EC2 (184-206)	2585,8	2585,2
EC2 (204-218)	1692,9	1691,5
EC2 (216-235)	2416,2	2418,8
EC2 (235-258)	2452,1	2454,9
EC2 (243-258)	1597,6	1598,6
EC5 (499-518)	2190,2	2189,3
EC5 (524-540)	1749,8	1750,4
EC5 (530-549)	2024,1	2024,1

FONTE: o autor (2009)

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E BIÓPSIAS DE PELE

As amostras de sangue periférico e biópsias de pacientes com pênfigo vulgar e foliáceo utilizadas neste estudo foram obtidas em coletas realizadas nas cidades de Campo Grande, MS - Hospital Adventista do Pênfigo, e em Ribeirão Preto, SP – Hospital das Clínicas da FMRP. As amostras dos indivíduos-controle foram obtidas dos familiares não consangüíneos e/ou amigos dos pacientes, que os acompanhavam no momento da coleta, e também de indivíduos sadios provenientes da região sul e sudeste do Brasil.

Antes de proceder à coleta do material, os indivíduos foram abordados para esclarecimento sobre os fins da pesquisa. Aceitando participar do estudo, o termo de anuência (anexo I) era lido e assinado pelos voluntários, que, em seguida, respondiam uma ficha de averiguação (anexo II). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Os pacientes foram diagnosticados como tendo PF, através dos resultados dos exames clínico e histopatológico. Através da análise do prontuário médico e

entrevista, averiguou-se a ocorrência de outras doenças concomitantes ao PF. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes não-tratados e em tratamento, com ou sem lesões ativas, na ausência de outras doenças autoimunes ou tratamento que pudesse interferir na análise da resposta imune. As biópsias de pele foram coletadas de pacientes com lesão ativa. Nos ensaios celulares foram analisados 9 pacientes PF sem tratamento e 13 pacientes PF com tratamento. Desses, 12 apresentavam a forma generalizada e 8 a forma localizada de PF. Dois pacientes não apresentavam lesões ativas no momento da coleta das amostras. Também foram analisados 23 controles sadios. Já para os ensaios humorais, esses números foram: 10 pacientes PF sem tratamento (5 com a forma localizada e 5 com a forma generalizada de PF), 13 pacientes PF com tratamento e 23 controles sadios. Dos pacientes, 12 apresentavam a forma generalizada e 9, a forma localizada de PF. Dois pacientes não apresentavam lesões ativas.

A relação completa de amostras de pacientes com PF e indivíduos sadios, incluindo a caracterização de cada amostra e tipificação *HLA-DRB1*, está apresentada na tabela 9.

Foram coletados 50 ml de sangue periférico de cada indivíduo, sendo 30 ml com heparina para separação de CMSP, 10 ml com EDTA para extração de DNA e 10 ml sem anticoagulante para obtenção de soro. De alguns pacientes, também foram retiradas biópsias de pele provenientes de áreas lesionadas. Esse procedimento foi realizado por médicos dermatologistas do HC-FMRP.

4.4 PROCESSAMENTO DO SANGUE PERIFÉRICO

4.4.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas através de separação por gradiente, utilizando solução de Ficoll Hypaque ($d = 1,077 \text{ g/ml}$) (Boyum, 1974).

TABELA 9 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES ENVOLVIDOS NO ESTUDO.

Código	Genótipo	Gênero	Tratamento	Forma	Idade	Ancestralidade	Biópsias
PF1	0102/04	F		generalizada	41	AF	
PF2	04/1301	F		localizada	32	EU	
PF3	04/1103	M		generalizada	68	AF	
PF4	0102/04	M		generalizada	15	AF	
PF5	01/1201	F		localizada	51	EU	
PF6	01/04	M		localizada	32	EU	
PF7	0102/0411	F		localizada	26	EU	
PF8	01/0404	F		generalizada	39	EU	
PF9	0402/0802	M		generalizada	33	EU	
PF10	nt	F		localizada			
PF11	0102/0302	F	X	sem lesão	45	EU	
PF12	0102/1401	M	X	sem lesão	57	EU	
PF13	01/14	F	X	generalizada	36	AF	X
PF14	0404/0701	F	X	localizada	52	AF	X
PF15	0102/0411	F	X	localizada	27	EU	X
PF16	0101/1503	F	X	generalizada	32	EU	X
PF17	0102/16	M	X	generalizada	12	AF	
PF18	0301/0701	M	X	generalizada	45	AF	
PF19	0102/0804	M	X	generalizada	19	AF	
PF20	0102/0404	F	X	localizada			
PF21	nt	F	X	generalizada			
PF22	nt	F	X	generalizada			
PF23	nt		X	generalizada			
CTL1	0301/04	M			37	EU	
CTL2	0101/1501	F			31	EU	
CTL3	09/12	F			30	ORI	
CTL4	0301/0701	F			26	EU	
CTL5	07/07	F			28	EU	
CTL6	0101/15	F			29	EU	
CTL7	09/15	F			32	ORI	
CTL8	0101/1301	F			20	EU	
CTL9	07/1302	F				AF	
CTL10	07/15	F				EU	
CTL11	04/11	M			33	AF	
CTL12	04/12	M			37	EU	
CTL13	09/13	M			30	ORI	
CTL14	nt	F			23	AF	
CTL15	nt	F			46	EU	
CTL16	0301/0701	F			23	EU	
CTL17	13/15	M			33	EU	
CTL18	nt	F			27	EU	
CTL19	nt	F				EU	
CTL20	14/14	F			22	EU	
CTL21	04/13	M			49	EU	
CTL22	nt	F			30	EU	
CTL23	07/13	F			23	AF	
CTL24	0101/1501	F			23	EU	
CTL25	0401/0701	M			27	EU	
CTL26	04/07	F			30	EU	

LEGENDA: PF: pênfigo foliáceo; CTL: indivíduos sadios; L: forma localizada; G: forma generalizada; M: gênero masculino; F: gênero feminino; EU: origem predominantemente européia; AF: origem mista, predominantemente africana.

FONTE: o autor (2009)

O sangue coletado em tubos heparinizados foi diluído 1:2 com solução salina 0,9% estéril. Em seguida, 10 ml do sangue diluído foram adicionados sobre um volume de 3 ml de Ficoll Hypaque.

Após 25 minutos de centrifugação a 1800 rpm, as CMSP localizadas na interface entre o Ficoll Hypaque e o plasma diluído com solução salina foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidas para um tubo de 50 ml. Completado esse volume com solução salina, as células foram centrifugadas por 10 minutos, a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas, transferidas para um tubo de 15 ml e novamente centrifugadas (1800 rpm por 8 minutos). Para a eliminação de plaquetas, centrifugou-se mais uma vez as células com 15 ml de solução salina, a 1000 rpm por 8 minutos. As células foram ressuspensas em 3 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-EUA), suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma-EUA), Hepes 10 mM (Sigma-EUA) e antibióticos (gentamicina e peflacin) nas concentrações de 40 ug/ml e 20 ug/ml, respectivamente.

4.4.2 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO CELULAR

Para futura obtenção de linhagens e clones de linfócitos T, CMSP e linhagens de biópsia foram congeladas na concentração de 2×10^6 a 10×10^6 células/ml, em tubo de congelamento (Nunc, EUA).

A suspensão de células foi centrifugada a 1800 rpm por 8 minutos e o botão celular ressuspenso em 1 ml de solução de congelamento. Esse passo foi realizado em banho de gelo.

As células foram guardadas em recipiente especial contendo isopropanol, que promove o congelamento gradual das células, a -80°C . Esse procedimento substituiu a necessidade dos seguintes passos: 20 minutos a 20 centímetros acima do nível de nitrogênio; 10 minutos a 10 centímetros acima do nível de nitrogênio; 10 minutos ao nível de nitrogênio. Depois os batoques foram guardados em container de nitrogênio líquido.

Para o descongelamento celular, o tubo contendo células foi imerso em banho-maria a 37°C . Antes do descongelamento completo, as células foram

transferidas para um tubo contendo 10 ml de meio RPMI 1640 completo e imediatamente centrifugadas a 1800 rpm, por 8 minutos. Após duas lavagens com RPMI 1640, as células foram ressuspensas em DMEM completo, de acordo com o tamanho do botão de células, e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi analisada com corante vital azul de Tripán e considerada ideal se fosse maior que 90%.

4.5 TIPIFICAÇÃO DO GENE *HLA-DRB1*

Após extração do DNA a partir do sangue total, pela técnica que utiliza fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK e cols., 1989), as amostras de DNA genômico foram submetidas à tipificação *HLA-DRB1* com o uso de PCR-SSOP (*Polimerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide Probes*) reversa, com o uso do kit *Lifecodes HLA reverse SSOP* (Stanford/EUA).

A amplificação utiliza uma quantidade maior do oligonucleotídeo iniciador *reverse* em relação ao *forward*, de modo que ocorra a geração de produtos amplificados monofilamentares reversos a partir do molde bifilamentar ao final do processo de PCR. O procedimento de tipagem utilizado nesse kit é baseado na hibridação de um produto monofilamentar amplificado por PCR, com sondas marcadas utilizando a tecnologia Luminex® (Gen-Probe Life Sciences Ltda, ENG). Essa tecnologia consiste em um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores de diferentes comprimentos de onda, que são então analisadas por Fluorímetro de Fluxo. Podem ser misturadas e analisadas até 100 populações de microesferas concomitantemente, pois cada população de microesferas pode ser distinguida por sua assinatura única de fluorescência ou cor. Dessa forma, microesferas de uma determinada cor contêm em sua superfície apenas sondas de oligonucleotídeos de mesma sequência. Sendo assim, diferentes sondas ligadas a microesferas podem ser utilizadas em um único tubo, substituindo o formato convencional de multi-poços.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)

As células foram ajustadas para uma concentração final de $2,5 \times 10^5$ células/poço e distribuídas no volume de 100 μ l em uma placa de 96 poços (fundo U), não estéril (Becton Dickson - Lincoln Park, EUA).

Após centrifugação a 1800 rpm, por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi desprezado, as células foram homogeneizadas em vórtex e incubadas com 25 μ l dos seguintes anticorpos monoclonais previamente titulados: anti-RCT $\alpha\beta$ FITC, anti-RCT $\gamma\delta$ PE, anti-CD3 Cy, anti-CD4 APC e anti CD8 APC (todos anticorpos da BD Pharmingen, EUA), por 30 minutos, na ausência de luz. Após 3 lavagens com tampão FACS, as células foram ressuspensas em 400 μ l do mesmo tampão e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickinson, EUA). Para cada amostra, foram analisados 5.000 eventos enquadrados como linfócitos. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas enquadradas como linfócitos.

4.7 OBTENÇÃO DE LINHAGEM DE LINFÓCITOS T

4.7.1 Linhagens de CMSP

Para a obtenção de linhagens de linfócitos T, 10^6 CMSP foram estimuladas com um conjunto de 4 a 6 peptídeos sintéticos da DSG1 (10 μ g/ml) com meio DMEM completo 10% SHNi (Invitrogen, EUA) em placa de 24 poços. No sexto dia de cultura, foram adicionados 40 U/ml de IL-2 (Biosource Inc., Califórnia). No décimo dia, as células foram estimuladas com 5 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA), de acordo com a curva de concentração pré-determinada, e 10^6 CMSP com HLA-DR compatível, irradiadas a 5000 rad. Em seguida, realizou-se a clonagem dessas linhagens.

No presente trabalho, foram estabelecidas 3 linhagens de CMSP para cada indivíduo, denominadas: G1 (peptídeos: EC1 (72-91), EC1 (88-105), EC1 (141-

158), EC2 (184-206)), G2 (peptídeos: EC2 (216-235), EC2 (235-258), EC2 (243-258), EC5 (524-540), EC5 (499-518)) e G3 (peptídeos: EC1 (52-72), EC1 (63-83), EC5 (539-549)), sem critério específico para a reunião desses grupos de peptídeos.

4.7.2 Linhagens de linfócitos T intralesionais

As biópsias previamente acondicionadas em meio DMEM completo, foram lavadas com 5 ml de meio RPMI e colocadas em placas de petri com 1 ml do mesmo meio. Em seguida foram picotadas em pequenos fragmentos com auxílio de bisturi e agulhas.

Depois, esses fragmentos de tecido foram distribuídos em placas de cultura celular de 96 poços com fundo chato, contendo 100 µl de meio DMEM 10% SHNi e 40U de IL-2 por poço. Após estímulo com CMSP (10^6 /ml) irradiado a 5000 rad, as placas foram então armazenadas em estufa de 5% de CO₂, a 37°C.

As linhagens de linfócitos T estabelecidas a partir do processamento das biópsias foram expandidas com 5,0 µg/ml PHA cerca de 15 dias após o processamento, em meio de cultura DEMEM completo contendo 40 U/ml de IL-2 e 2,5 ng/ml de IL-7 e IL-15, em presença de 10^6 células/ml de CMSP irradiadas a 5000 rad. Após expansão, as linhagens provenientes de biópsia de pele (Figura 14) foram submetidas à clonagem.

4.8 CLONAGEM DE LINFÓCITOS T

A clonagem a partir de linhagens tanto de CMSP como de LT infiltrantes de biópsia de pele, foi realizada através da técnica de diluição limitante (1 célula/poço), em placas de 96 poços (meia-área) de fundo chato (Becton Dickson, Lincoln Park, EUA), na presença de 5,0 µg/ml de PHA, CMSP irradiadas a 5000 rad (10^6 /ml) e meio DMEM completo enriquecido com 40 U/ml de IL-2 e 2,5 ng/ml de IL-7 e IL-15. Placas com mais de 30% de crescimento foram descartadas. Os clones obtidos foram posteriormente expandidos com estímulo de PHA, para análise de família de RCT e testes de proliferação antígeno-específica.

FIGURA 14 – FOTOGRAFIA DO CULTIVO DE LINFÓCITOS
PROVINIENTES DA BIÓPSIA DE PELE



LEGENDA: fotografia de cultivo de LT intralesionais em placa de 96 poços (fundo chato), contendo fragmentos de biópsia de lesão de pele. Aumento: 40X.

FONTE: o autor (2009)

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR DE CÉLULAS T (RCT) DE CLONES DE LINFÓCITOS T

4.9.1 Extração de RNA

A extração de RNA de clones de LT foi realizada através da técnica descrita por Chomczynski *et al.* (1987), que utiliza a solução de Trizol (Invitrogen, EUA) para isolar RNA total. Partindo-se $1-5 \times 10^6$ células previamente ressuspensas em 1 ml de Trizol e congeladas a -80°C , estas foram descongeladas e homogeneizadas vigorosamente, seguindo-se incubação a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos para a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas.

Na sequência, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio para cada mililitro de

Trizol, seguido de agitação vigorosa do tubo por 15 segundos, incubação por 3 minutos a TA e centrifugação por 15 minutos a 13000 rpm, a 4°C. Como resultado dessa centrifugação há a separação da amostra em três fases: aquosa, interface e orgânica. Com o intuito de precipitar o RNA, a fase aquosa foi transferida para tubos de 1,5 ml contendo 0,5 ml de álcool isopropílico (Nuclear, BRA), para cada mililitro de Trizol utilizado, seguida de homogeneização por inversão, incubação por 10 minutos a TA e centrifugação por 15 minutos, a 13000 rpm, a 4°C.

O sobrenadante foi então removido e o pellet de RNA lavado com 1 ml de etanol 75%, seguido de centrifugação a 8000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após evaporação do etanol residual, o pellet foi ressuspensão em 10 µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato; Invitrogen, Carlsbad, EUA) e incubado a 65°C por 10 minutos, sendo então centrifugado e estocado a -80°C para posterior transcrição do RNA em cDNA.

Após extração, o RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nanômetros (nm) (Nano Drop ND-100 – MET, EUA). A pureza da amostra foi medida através da análise das leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo considerada uma amostra pura aquela que apresentou valores entre 1,8 e 2,0 para o quociente DO 260 / DO 280 (Sambrook, 1989).

Para eliminar a possível contaminação com DNA genômico as amostras foram tratadas com a enzima *DNase I* (*DNase I*, Amplification Grade, Invitrogen, Carlsbad, EUA) antes de realizar o procedimento de transcrição reversa. Para tal, utilizou-se 1 µg de RNA total, 1 µl de 10X do tampão de reação para *DNase I* (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl), 1 U de *DNase I* (1 unidade/µL) e H₂O q.s.p. 10 µl. Após o preparo da reação, esta foi incubada por 15 minutos a TA, seguida de inativação da enzima *DNase I* com 1 µl de EDTA (25 mM) e aquecimento por 10 minutos a 65°C, em banho seco.

4.9.2 Transcrição reversa para cDNA

Após a quantificação da amostra de RNA, validação de sua pureza e

tratamento com *DNase I*, realizou-se a transcrição reversa do RNA para cDNA com o uso de um kit comercial (Superscript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Foram adicionados em um tubo de 0,2 ml: 1 µg de RNA total, 1 µg de oligo(dT)20 (0,5 ug/µl), 1 µl de dNTPs 10 mM e água DEPC q.s.p. 12 µl. Esta mistura foi incubada a 65°C, por 5 minutos em termociclador para remoção de estruturas secundárias e, então, colocada em gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida, foi preparada a mistura de síntese de cDNA: 1X tampão para PCR 5X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 25 mM), 0,01M de DTT (0,1 M), 40U de RNaseOUT™ (40U/µL). Essa reação foi incubada a 42°C, por 2 minutos seguido da adição de 200 U da enzima transcriptase reversa SuperScript III™ RT (200 U/µL). Seguiu-se a ciclagem descrita a seguir: 42°C por 50 minutos, seguidos de 70°C por 15 minutos e então o cDNA foi armazenado a -20°C.

4.9.3 Caracterização do RCT via PCR-VβCβ

Antes de realizar a amplificação dos segmentos Vβ-Cβ do RCT utilizando oligonucleotídeo iniciadores específicos para cada uma das famílias Vβ, testou-se a qualidade do cDNA transcrito através da amplificação do gene *HPRT*, responsável pela síntese da enzima para Hipoxantina Fosforibosil Transferase (HPRT, do inglês, “hypoxanthina phosphoribosyl transferase”), que tem papel importante na síntese de nucleotídeos e está presente constitutivamente nas células, sendo utilizada como controle de expressão de gene endógeno para a validação da reação de transcrição do RNA em cDNA. Para esta reação foram utilizados 2,5% do cDNA transcrito, tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl e 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 0,3 µM de cada *oligonucleotídeo iniciador* (Tabela 10), 1 U de *Taq* DNA polimerase (5 unidades/µl) e água q.s.p. 20µl. A reação foi processada em termociclador por 30 ciclos que compreendem: desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguidos de anelamento a 58°C por 30 segundos e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto desta reação foi analisado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml), e submetido à corrida eletroforética a 100V durante 40 minutos. O tamanho

esperado do produto de PCR é de 289 pares de base.

TABELA 10 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA HPRT

OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
HPRT 5'	5' CCTGCTGGATTACATCAAAGCACT 3'
HPRT 3'	5' AGGACCCCACGAAGTGTTGGA 3'

FONTE: o autor (2009)

A análise da diversidade do repertório de linfócitos T foi realizada a partir da amplificação por PCR, dos segmentos V β -C β do RCT, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma das famílias V β . Para a reação, são utilizados 4% de cDNA transcrito, tampão para PCR 10X (500 mM KCl e 100 mM Tris-HCl), 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0,5 μ M do oligonucleotídeo iniciador CB e 0,5 μ M do oligonucleotídeo iniciador V β específico, 1 U de *Taq* DNA polimerase (5U/ μ L) e água q.s.p. 20 μ L. A reação foi processada em termociclador (modelo 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, EUA) por 1 minuto e 30 segundos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, completados com uma extensão final de 4 minutos a 72°C. O produto desta reação foi analisado em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) e submetido à corrida eletroforética a 100V, durante 1 hora. Na Tabela 11, estão contidas as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação das 24 famílias V β e o tamanho esperado do produto de PCR. Todos os oligonucleotídeos iniciadores possuem mesma temperatura de anelamento.

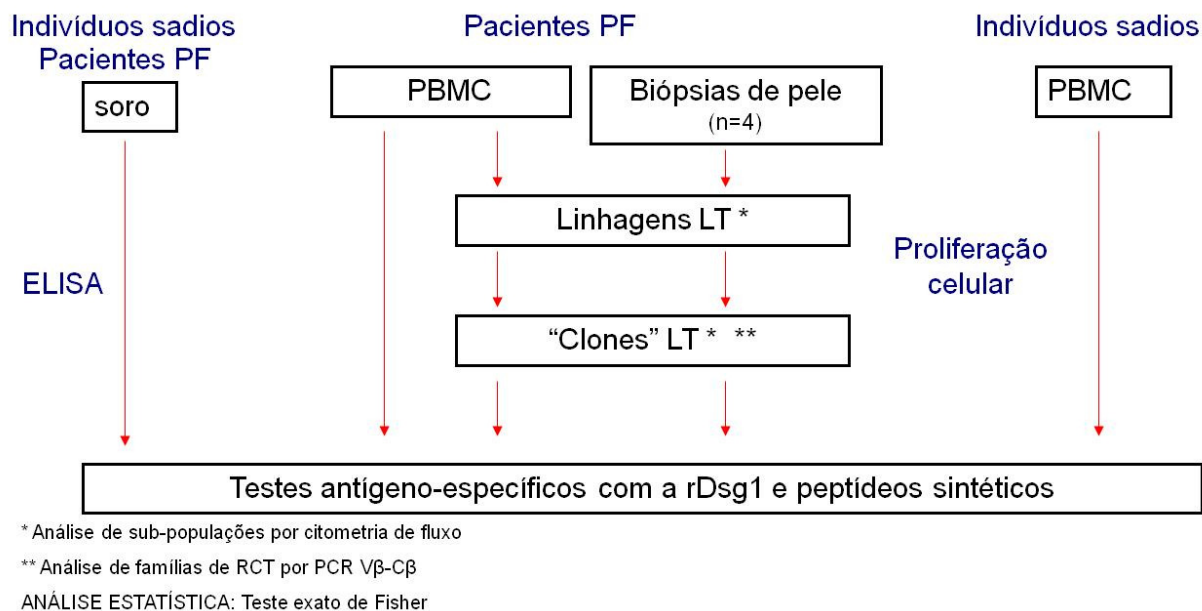
TABELA 11 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS VB DO RCT

FAMÍLIA Vβ E SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADORES	Vβ-Cβ (pares de bases)	ESPECIFICIDADES AMPLIFICADAS
VB1 5' CCGCACAAACAGTTCCCTGACTTGC 3'	322	VB1S1
VB2 5' GGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA 3'	360	VB2S1,S2
VB3 5' CGCTTCTCCCTGGATTCTGGAGTCC 3'	299	VB3S1
VB4 5' TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA 3'	325	VB4S1
VB5 5' AAGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC 3'	299	VB5S1,S2, S3,S5, S6, S7,S8
VB6 5' CTCTGAAGATCCAGCGCACAGAGC 3'	292	VB6S1, S3, S4, S5, S7, S11, S14
VB7 5' CCTGAATGCCCAACAGCTCTCTC 3'	320	VB7S1, S2, S3
VB8 5' CCATGATGCGGGGACTGGAGTTGC 3'	406	VB8S1, S2, S3
VB9 5' TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC 3'	279	VB9S1, S2
VB10 5' CCACGGAGTCAGGGGACACAGCAC 3'	277	VB10S1
VB11 5' TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA 3'	276	VB11S1
VB12 5' TGTCACCAGACTGGGGAACCACCAC 3'	449	VB12S2, S3, S4
VB13 5' CACTGCGGTGTACCCAGGATATGA 3'	456	VB13S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8, S9
VB14 5' GGGCTCGGCTTAAGGCAGACCTAC 3'	398	VB14S1
VB15 5' CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG 3'	311	VB15S1
VB16 5' GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG 3'	279	VB16S1
VB17 5' TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA 3'	295	VB17S1
VB18 5' CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC 3'	322	VB18S1
VB19 5' TCTCAATGCCCAAGAACGCACCC 3'	320	VB19S1
VB20 5' TGCCCCAGAATCTCTCAGCCTCCA 3'	337	VB20S1
VB21 5' TCCAGCCTGCAAAGCTTGAGGACT 3'	283	VB21S1, S3, S4
VB22 5' GATCCGGTCCACAAAGCTGG 3'	287	VB22S1
VB23 5' TGAAGTGAACATGAGCTCCTTGG 3'	295	VB23S1
VB24 5' GACATCCGCTCACCAGGCCTG 3'	288	VB24S1
CB 5' CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG 3'		

FONTE: o autor (2009)

4.10 ENSAIOS CELULARES

Os ensaios celulares, e também os ensaios humorais, foram realizados seguindo as etapas mostradas no diagrama abaixo:



4.10.1 Determinação da concentração ótima de proteína recombinante e peptídeo para a análise de resposta celular

Para determinar a concentração de rDSG1 e peptídeos a serem utilizadas na análise da resposta celular foram realizados ensaios de proliferação com CMSP de 3 pacientes e 3 indivíduos saudáveis, 2 linhagens de CMSP e 2 linhagens de biópsia e 3 clones, com os peptídeos EC2 235-258, EC5 499-518, EC5 524-540 e EC5 530-549 e também com a proteína recombinante, nas seguintes concentrações: 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$.

Após análise das curvas, estabeleceu-se que ensaios com CMSP seriam realizados com 20 e 10 $\mu\text{g/ml}$, de rDSG1 e peptídeos, respectivamente. Já para linhagens e clones, as concentrações estabelecidas para ensaio foram: 10 e 5

µg/ml, de rDSG1 e peptídeos, respectivamente. Observou-se também que concentrações altas de peptídeo (20 e 40 µg/ml) pareceram promover efeito tóxico sobre a célula, levando à morte destas e diminuição dos índices de estimulação (IE).

4.10.2 Ensaio de proliferação antígeno-específica

Para o ensaio de proliferação de CMSP foram utilizadas 10^5 células/poço em placas de 96 poços de fundo U (Becton Dickson, Lincoln Park, NJ) em 200 µl de DMEM e 3×10^4 células/poço para linhagens e clones de LT. Os testes foram realizados em triplicata na presença dos peptídeos sintéticos e proteína recombinante, utilizando as concentrações estabelecidas anteriormente. O controle negativo (CN) foi composto somente pela suspensão de células em meio DMEM. O controle positivo foi composto por PHA (2,5 ou 5,0 µg/ml, de acordo com a curva pré-estabelecida).

Após 5 dias (CMSP) e 3 dias (linhagens e clones de LT) de incubação das placas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e a 37°C, as células foram incubadas com 0,5µ Ci/poço de timidina triciada (Thy) (Amersham Life Sciences). Após mais 18 horas em estufa, as células foram recolhidas através do *Cell Harvest* e a contagem da incorporação da timidina foi realizada através do método de cintilação líquida para radiação β, no contador de radiação beta – Beta Place (Wallac-Pharmacia, EUA). O IE foi calculado pela média das triplicatas para um determinado antígeno, em cpm (contagem por minuto), dividido pela média da triplicata do controle negativo. Foram considerados positivos valores IE ≥ 2,0.

4.11 ESTUDO DA RESPOSTA HUMORAL ANTI-IgG TOTAL PELO MÉTODO DE ELISA

ELISA (do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma/soro sanguíneo.

Após padronização da concentração de peptídeo e conjugado, foram realizados testes com o soro de pacientes e indivíduos saudáveis, frente a rDSG1 e seus peptídeos. Para todos os ensaios, o controle negativo consistiu de um *pool* de soros de indivíduos saudáveis não reativos ao peptídeo S2-10 da proteína miosina cardíaca. Já o controle positivo foi formado por um *pool* de soros de indivíduos reativos ao mesmo peptídeo, conforme dados provenientes de estudos anteriores realizados pelo grupo de Febre Reumática (Laboratório de Imunologia – InCor/FMUSP) (GUILHERME e cols., em publicação). Como controle interno da reação, foi utilizado IgG humana (BD Pharmingen - EUA).

Placas de alta ligação (Nunc, EUA) foram sensibilizadas com peptídeos sintéticos da proteína DSG1 na concentração de 25 µg/ml ou com a proteína recombinante (rDSG1) na concentração de 20 µg/ml, diluídos em tampão bicarbonato-carbonato 0,05M pH=9,6 (Merk, EUA). Após incubação durante a noite a 4°C, as placas foram lavadas 10 vezes com 200 µl/poço de PBS-Tween 1% (PBS-T). Na sequência, os sítios reativos da placa foram bloqueados com 200 µl/poço de tampão de bloqueio, a 37°C por uma hora. Transcorrido esse tempo, as placas foram lavadas 10 vezes com 200 µl/poço de PBS-T e incubadas a 4°C com 100 µl/poço do soro diluído (1:100) em tampão diluente de amostra. Na sequência, as placas foram lavadas 10 vezes com 200 µl/poço de PBS-T seguido da incubação de 100 µl do conjugado anti-IgG total humano marcado com peroxidase (BD Pharmingen - EUA) e produzido em coelho, na diluição de 1:7500, 30 minutos a 37°C. Novamente as placas foram lavadas 10 vezes com 200 µl/poço de PBS-T e então incubadas com 100 µl de substrato/poço (4 mg de orto-fenilenodiamina – OPD, 10 ml de tampão citrato pH=5,0 e 4 µl de H₂O₂ 30%) por 30 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida com 50 µl de ácido sulfúrico 2M e as placas lidas em leitora de ELISA (Bio-Rad – modelo: 3550, EUA), em um comprimento de onda de 490 nanômetros.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.12.1 Resposta Celular

Os testes de proliferação celular foram avaliados pelo índice de estimulação (IE). O IE foi calculado pela média das triplicatas para um determinado antígeno, em cpm (contagem por minuto), dividido pela média da triplicata do controle negativo ($IE = \text{média de cpm do antígeno testado} / \text{média de cpm do CN}$). Foram considerados positivos valores de $IE \geq 2,0$.

A proporção de resultados positivos foi comparada entre os grupos de pacientes e controles através do teste exato de Fisher (ROSNER, 1986). O nível de significância de 5% foi adotado para os testes.

4.12.2 Resposta Humoral

Para estabelecer o ponto de corte da reação entre soros reagentes e não reagentes, foram utilizados os controles negativos dos testes com a rDSG1 e peptídeos. Dessa forma, o “*cut off*” foi calculado utilizando-se a média aritmética dos valores de absorbância dos controles negativos de 42 placas de ELISA, acrescentando-se ao valor, dois desvios padrão da média. A DO de corte para positividade nos ensaios de ELISA realizados neste trabalho, foi 0,240.

A proporção de resultados positivos foi comparada entre os grupos de pacientes e controles através do teste exato de Fisher (ROSNER, 1986). O nível de significância de 5% foi adotado para os testes.

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DA DESMOGLEÍNA 1

Ambos os plasmídeos contendo a região codificadora da desmogleína 1, clonada em vetor de clonagem *Bluescript*, pKSII 536 e pKSII 812, foram eluídos do papel filtro, e, a partir da transformação em bactéria por choque término, crescimento e extração do DNA plasmidial, obtivemos cerca de 60 µg de cada DNA plasmidial para iniciarmos os procedimentos de clonagem no vetor de expressão. A amplificação da região codificadora da porção extracelular de DSG1 para inserção no vetor de expressão pLPCX foi realizada utilizando como molde, a região codificadora da DSG1 contida no vetor pKSII 536.

Sete diferentes clones pLPCX-DSG1 foram obtidos a partir da ligação entre a região codificadora da porção extracelular de DSG1 e o vetor de expressão pLPCX. Desses, três foram escolhidos aleatoriamente para o seqüenciamento. O seqüenciamento foi primeiramente concluído para o clone 3, o qual, estando com a sequência correta, foi utilizado para a expressão da rDSG1. O alinhamento do clone três, obtido a partir da ligação entre a porção extracelular da região codificadora de DSG1 e o vetor pLPCX, com a sequência da desmogleína 1 (NM_001942), depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), pode ser visto na Figura 15.

A transfecção transitória do plasmídeo pLPCX-DSG1 foi realizada em células 293T e teve como objetivo, analisar o perfil de expressão da proteína recombinante da desmogleína. O mesmo procedimento foi feito em paralelo com um plasmídeo contendo o gene da proteína verde fluorescente – pLPCX-EGFP (do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*), que serviu como controle positivo da transfecção. Diante dos resultados apresentados na Figura 16, concluiu-se que a desmogleína 1 recombinante (rDSG1) foi expressa e secretada para o meio de cultura, não tendo ficado fração detectável pela técnica, retida na célula. Aqui, a proteína EGFP não só serviu como controle positivo de transfecção, mas também como controle negativo para a especificidade do anticorpo anti-His,

que reconhece especificamente a cauda de histidina (6xHis) localizada na porção carboxi-terminal da proteína rDSG1. A proteína rDSG1 possui cerca de 61 kDa conforme estimativa realizada (ExPaSy Proteomics Server).

FIGURA 15 – SEQÜENCIAMENTO DO PLASMÍDEO pLPCX-DSG1

```

CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAG
CGCTACCGGACTCAGATCCACCATGGACTGGAGTTTCTTCAGAGTAGTTGCAATGCTGTT
|||||
ATGGACTGGAGTTTCTTCAGAGTAGTTGCAATGCTGTT

CATTTTTCTGGTGGTGGTAGAATGGCATTCAATCCGAAGGCAGAAACGTGAATGGATCAA
|||||
CATTTTTCTGGTGGTGGTAGAATGGCATTCAATCCGAAGGCAGAAACGTGAATGGATCAA

GTTTCGAGCAGCCTGTCGTGAAGGTGAAGACAACCTCAAAGAGGAACCAATCGCCAAAAT
|||||
GTTTCGAGCAGCCTGTCGTGAAGGTGAAGACAACCTCAAAGAGGAACCAATCGCCAAAAT

TCACTCAGATTGTGCTGCAAACCAGCAAGTTACATACCGCATCTCTGGAGTAGGAATTGA
|||||
TCACTCAGATTGTGCTGCAAACCAGCAAGTTACATACCGCATCTCTGGAGTAGGAATTGA

TCAGCCACCATATGGGATCTTTGTCATTAATCAGAAAACCTGGTGAAATTAATATAACATC
|||||
TCAGCCACCATATGGGATCTTTGTCATTAATCAGAAAACCTGGTGAAATTAATATAACATC

CATAGTTGATCGAGAGGTCACTCCTTTCTTCATTATCTACTGCCGAGCTCTGAACTCAAT
|||||
CATAGTTGATCGAGAGGTCACTCCTTTCTTCATTATCTACTGCCGAGCTCTGAACTCAAT

GGGCCAAGATTTAGAGAGGCCTCTAGAGCTCAGAGTCAGGGTTTTGGATATAAATGACAA
|||||
GGGCCAAGATTTAGAGAGGCCTCTAGAGCTCAGAGTCAGGGTTTTGGATATAAATGACAA

CCCTCCAGTGTTTTCAATGGCTACATTTGCAGGACAAAATAGAAGAAAATTCTAATGCAAA
|||||
CCCTCCAGTGTTTTCAATGGCTACATTTGCAGGACAAAATAGAAGAAAATTCTAATGCAAA

TACACTGGTGATGATACTCAATGCTACTGACGCAGATGAACCGAACAAATTTGAACTCAAA
|||||
TACACTGGTGATGATACTCAATGCTACTGACGCAGATGAACCGAACAAATTTGAACTCAAA

AATAGCCTTCAAGATTATAAGACAAGAACCTTCAGATTCACCAATGTTTATTATCAACAG
|||||
AATAGCCTTCAAGATTATAAGACAAGAACCTTCAGATTCACCAATGTTTATTATCAACAG

AAATACTGGAGAAATTCGAACGATGAATAATTTCTAGACAGAGAGCAATACGGCCAGTA
|||||
AAATACTGGAGAAATTCGAACGATGAATAATTTCTAGACAGAGAGCAATACGGCCAGTA

TGCTCTTGCTGTAAGAGGCTCTGACCGAGATGGTGGGGCAGATGGCATGTGACGCGAATG
|||||
TGCTCTTGCTGTAAGAGGCTCTGACCGAGATGGTGGGGCAGATGGCATGTGACGCGAATG

TGAGTGCAACATTAAAATCCTCGATGTCAATGATAATATCCCTTACATGGAACAGTCTTC
|||||
TGAGTGCAACATTAAAATCCTCGATGTCAATGATAATATCCCTTACATGGAACAGTCTTC

```

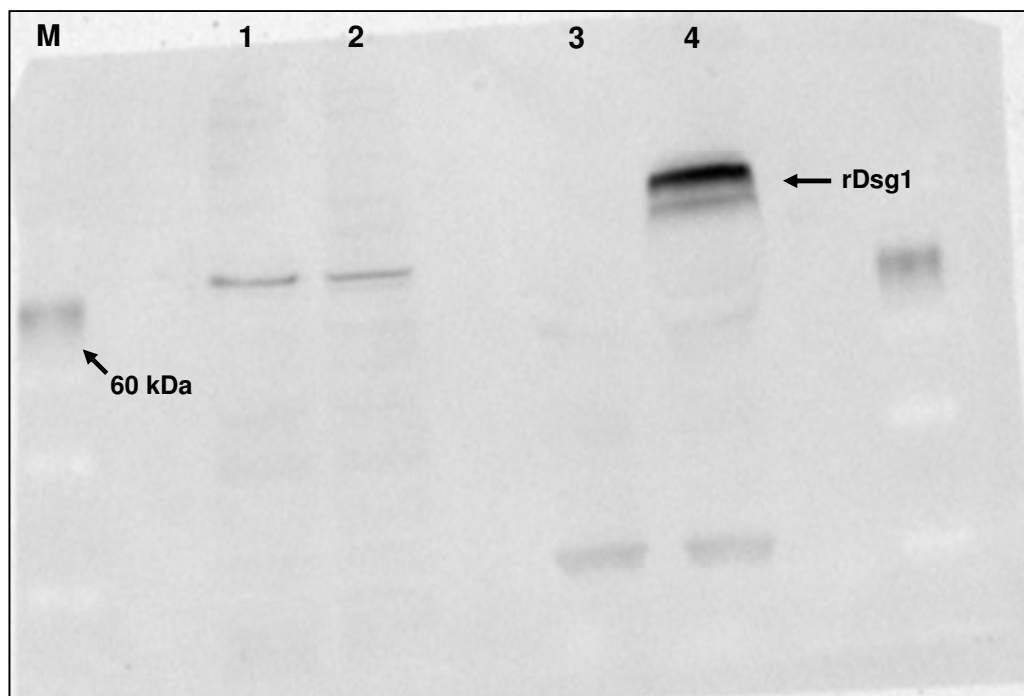
ATATACCATAGAAATTCAAGAAAATACTCTAAATTCAAATTTGCTCGAGATTAGAGTAAT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 ATATACCATAGAAATTCAAGAAAATACTCTAAATTCAAATTTGCTCGAGATTAGAGTAAT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGATTTGGATGAAGAGTTCTCAGCTAACTGGATGGCAGTAATTTTCTTTATCTCTGGAAA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGATTTGGATGAAGAGTTCTCAGCTAACTGGATGGCAGTAATTTTCTTTATCTCTGGAAA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGAAGGAAATTGGTTTGAGATAGAAATGAATGAAAGAACAAATGTGGGAATTTTAAAGGT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGAAGGAAATTGGTTTGAGATAGAAATGAATGAAAGAACAAATGTGGGAATTTTAAAGGT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGTTAAGCCCTTAGATTATGAAGCTATGCAGAGTCTGCAACTCAGTATTGGTGTGAGAAA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGTTAAGCCCTTAGATTATGAAGCTATGCAGAGTCTGCAACTCAGTATTGGTGTGAGAAA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TAAAGCTGAATTTTCATCATTCAATTATGTCTCAATATAAACTGAAAGCATCTGCAATTTTC
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TAAAGCTGAATTTTCATCATTCAATTATGTCTCAATATAAACTGAAAGCATCTGCAATTTTC
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGTGACTGTGTTAAATGTAATTGAAGGCCAGTGTTTCGTCCAGGTTCAAAGACATATGT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGTGACTGTGTTAAATGTAATTGAAGGCCAGTGTTTCGTCCAGGTTCAAAGACATATGT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGTAAGTGGTAATATGGGATCAAATGATAAAGTGGGAGACTTTGTAGCTACTGACCTGGA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TGTAAGTGGTAATATGGGATCAAATGATAAAGTGGGAGACTTTGTAGCTACTGACCTGGA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 CACAGGTAGACCTTCAACGACTGTTAGGTATGTAATGGGAAATAATCCAGCTGACCTGCT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 CACAGGTAGACCTTCAACGACTGTTAGGTATGTAATGGGAAATAATCCAGCTGACCTGCT
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 AGCTGTTGATTCAAGAACAGGCAAACCTCACTTTGAAAAATAAAGTTACCAAGGAACAGTA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 AGCTGTTGATTCAAGAACAGGCAAACCTCACTTTGAAAAATAAAGTTACCAAGGAACAGTA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 CAATATGCTCGGAGGAAATACCAAGGAACGATTCTCTCTATAGATGATAATCTTCAAAG
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 CAATATGCTCGGAGGAAATACCAAGGAACGATTCTCTCTATAGATGATAATCTTCAAAG
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 AACTTGCACTGGTACAATTAATATTAACATTCAAAGTTTTGGTAATGACGACAGGACTAA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 AACTTGCACTGGTACAATTAATATTAACATTCAAAGTTTTGGTAATGACGACAGGACTAA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TACAGAGCCGAACACTAAAATTACTACCAATACTGGCAGACAAGAAAGTACTTCTTCCAC
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TACAGAGCCGAACACTAAAATTACTACCAATACTGGCAGACAAGAAAGTACTTCTTCCAC
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TAACTATGATACCAGCACAACTTCTACTGACTCTAGCCAAGTATATTCTTCTGAACCCGG
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 TAACTATGATACCAGCACAACTTCTACTGACTCTAGCCAAGTATATTCTTCTGAACCCGG
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 AAACGGAGCCAAAGATTTGTTATCAGACAATGTACATTTTGGTCCTCATCACCATCACCA
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 AAACGGAGCCAAAGATTTGTTATCAGACAATGTACATTTTGGTCCT

TCACATAGAGCTTCGAATTCGTTAGGCCATTAAGCCATGTCGACAAGCGGCCGCTCGGCCGAAA

LEGENDA: oligonucleotídeo iniciador pLPCX 5` marcado em amarelo;
 oligonucleotídeo iniciador pLPCX 3` marcado em verde;
 códons de início e término de tradução em letra vermelha;
 sequência codificadora da cauda de histidina em letra azul.

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 16 – WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DE PLPCX-DSG1 EM 293T



LEGENDA: **M**: marcador de peso molecular; **1**: lisado celular de pLPCX-EGFP; **2**: lisado celular de pLPCX-DSG1; **3**: sobrenadante de pLPCX-EGFP; **4**: sobrenadante de pLPCX-DSG1.

FONTE: o autor (2009)

Uma vez que a rDSG1 foi secretada com sucesso a partir da transfecção transitória em células 293T, houve a necessidade de obtenção de uma população de células que expressassem essa proteína de modo estável. Isso porque há um grande consumo de plasmídeo e lipofectamina para cada placa de transfecção transitória, rendendo ao final apenas 2 ml de sobrenadante contendo cerca de 20 µg da proteína recombinante.

Dessa forma, optou-se por utilizar um sistema retroviral para a expressão da proteína recombinante, pois os retrovírus possuem características que os tornam bastante eficientes como veículo de entrega gênica. Seu ciclo de vida inclui uma fase integrada no DNA cromossomal da célula hospedeira. Além disso, dependendo do contexto local da cromatina, o promotor retroviral pode super-expressar genes contidos dentro do seu genoma. Para tanto, três etapas são essenciais: (i) a inserção do plasmídeo pLPCX-DSG1 em uma linhagem empacotadora, que secreta retrovírus contendo o gene de interesse, (ii)

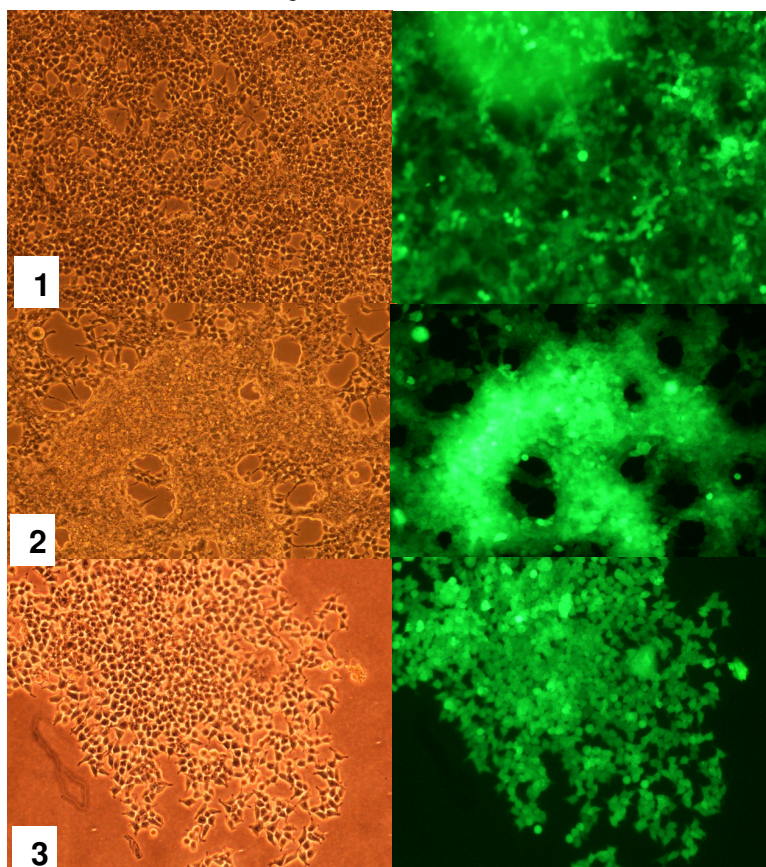
transdução do sobrenadante viral na linhagem 293T para recombinação e integração do retrovírus com o DNA genômico, expressando assim a proteína de modo estável, (iii) seleção por antibiótico das células com o cDNA plasmidial contendo o gene de interesse integrado (NOLAN LAB, 2009). O resultado da seleção com puromicina pode ser visualizado na Figura 17.

Através do ensaio de *Western Blot*, a expressão de rDSG1 após a seleção com as diferentes concentrações de antibiótico foi analisada, ocorrendo em maior grau na população de células selecionada com 2 ug/ml de puromicina. Utilizando o mesmo ensaio, também avaliou-se a quantidade de SFB e seu efeito na expressão da proteína recombinante. Foram cultivadas células 293T pLPCX-DSG1 selecionadas com 2 ug/ml de puromicina em meio DMEM sem soro, e também nas seguintes condições: 2,5, 5 e 10% de SFB. Os resultados mostraram que a expressão de rDSG1 é dependente de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura, diminuindo gradativamente com a diminuição da porcentagem de soro presente no meio, apresentando níveis nulos de expressão em meio sem soro.

Células 293T contendo o plasmídeo pLPCX-DSG1, selecionadas com 2 ug/ml de puromicina, foram cultivadas e o meio de cultura foi coletado a cada passagem. Em seguida, esse meio de cultura foi purificado e as diferentes frações do processo de purificação foram analisadas em gel SDS-PAGE 10% (Figuras 18 e 19), e a purificação da rDSG1 foi confirmada por *Western Blot* utilizando o anticorpo policlonal anti-His (Cell Signalling, EUA) (Figura 20).

Na purificação de 100 ml de meio de cultura contendo a rDSG1 secretada, foram obtidos 1,5 mg de proteína purificada (500 ng/ μ l).

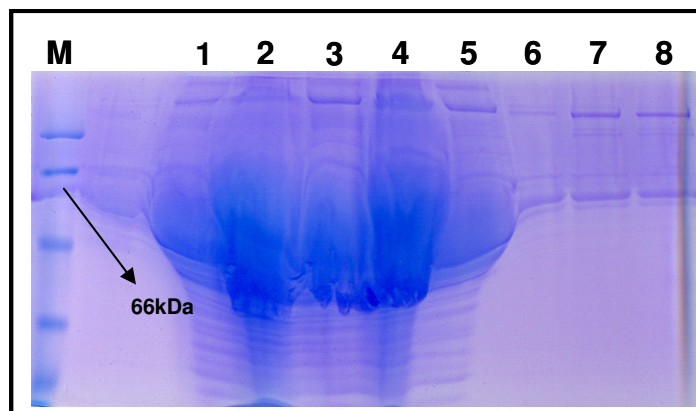
FIGURA 17 – EXPRESSÃO DE EGFP APÓS SELEÇÃO COM PUROMICINA



LEGENDA: Cultivo de células 293T em diferentes concentrações de puromicina, fotografadas em luz visível (esquerda) e fluorescente (direita). Concentração de puromicina: 1- 1 µg/ml; 2- 2 µg/ml; 3- 4 µg/ml. Aumento: 20X.

FONTE: o autor (2009)

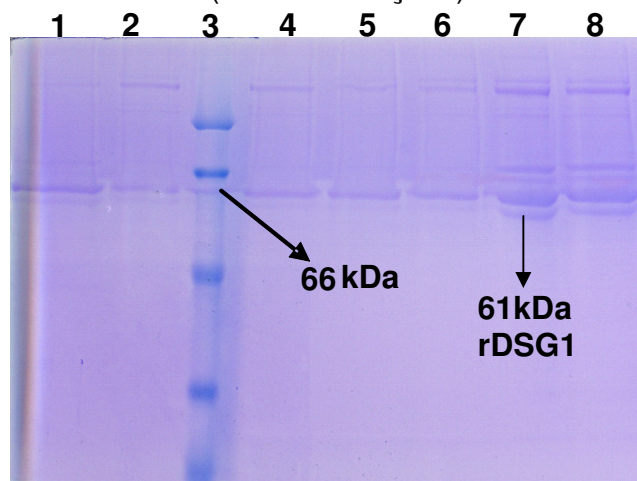
FIGURA 18 – PURIFICAÇÃO DA rDSG1



LEGENDA: **M** – marcador de peso molecular; **1**- meio de cultura; **2**- meio de cultura concentrado; **3**- resina; **4**- *flow through*; **5**- Lavagem 40 mM imidazol; **5** e **6**- eluições 80mM imidazol; **7**- eluição 100mM imidazol.

FONTE: o autor (2009)

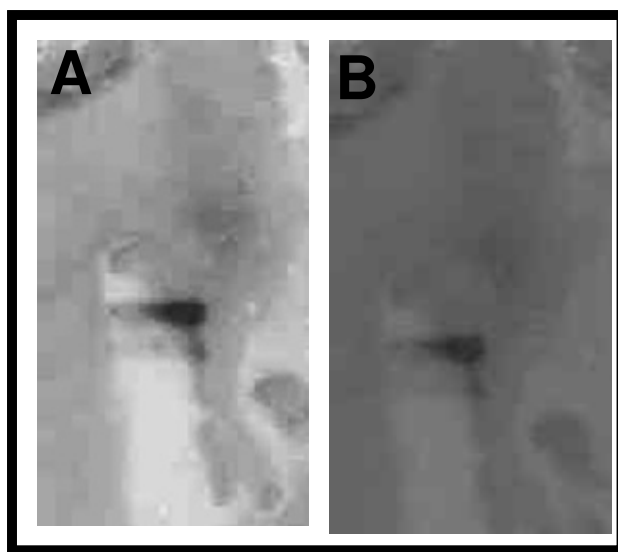
FIGURA 19 – PURIFICAÇÃO DA rDSG1 (CONTINUAÇÃO)



LEGENDA: **1**- eluição 100mM imidazol.; **2** e **4**- eluições 250mM imidazol; **3**- marcador de peso molecular; **5** e **6** -eluições 500mM imidazol; **7**- proteína eluída concentrada; **8** – proteína eluída concentrada, dialisada e filtrada.

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 20 – WESTERN BLOT DA rDSG1 PURIFICADA



LEGENDA: **A** e **B**: revelação de western blotting em filme de raio x da proteína concentrada, filtrada e dialisada.

FONTE: o autor (2009)

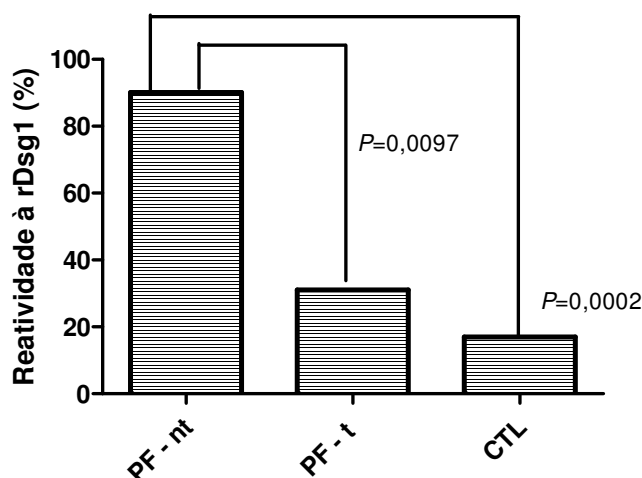
5.2 RESPOSTA HUMORAL À PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 RECOMBINANTE

Para a análise da resposta humoral à rDSG1, as amostras de soro dos pacientes foram agrupadas de acordo com seus históricos terapêutico (indivíduos não-tratados e em tratamento) e clínico (forma localizada ou generalizada de PF).

Em uma primeira abordagem, foi analisada a capacidade de reconhecimento da rDSG1 por anticorpos presentes no soro de pacientes em tratamento com corticosteróides ($n=13$), pacientes não-tratados ($n=10$) e indivíduos sadios ($n=23$). Enquanto 90% dos pacientes não-tratados reconheceram o autoantígeno de pênfigo foliáceo, a mesma resposta só foi obtida em 31% dos pacientes em tratamento e 17% dos indivíduos sadios (Figura 21). A rDSG1 foi preferencialmente reconhecida no grupo de pacientes sem tratamento, quando comparada ao reconhecimento obtido em pacientes com tratamento ($P=0,0097$) e indivíduos sadios ($P=0,0002$) (Figura 21). A reatividade individual de pacientes não tratados e em tratamento e indivíduos sadios (controles), representada pelos valores de DO, está mostrada na Figura 22.

Em uma segunda abordagem, foi analisada a capacidade de reconhecimento da rDSG1 pelo soro de pacientes com as formas localizada (n=9) ou generalizada (n=12) de PF. Ambos os grupos incluíram pacientes em tratamento ou não-tratados analisados pela abordagem anterior. Houve reconhecimento do autoantígeno de PF em 77,8% dos pacientes com a forma localizada e em 50% dos pacientes com a forma generalizada da doença (Figura 23). Quando a reatividade à rDSG1 encontrada nesses grupos foi comparada àquela encontrada em indivíduos sadios (17%), observou-se o reconhecimento preferencial da proteína recombinante na forma localizada da doença ($P=0,0026$) (Figura 23). A reatividade individual de pacientes com as formas localizada e generalizada de PF e controles, representada pelos valores de DO, está mostrada na Figura 24.

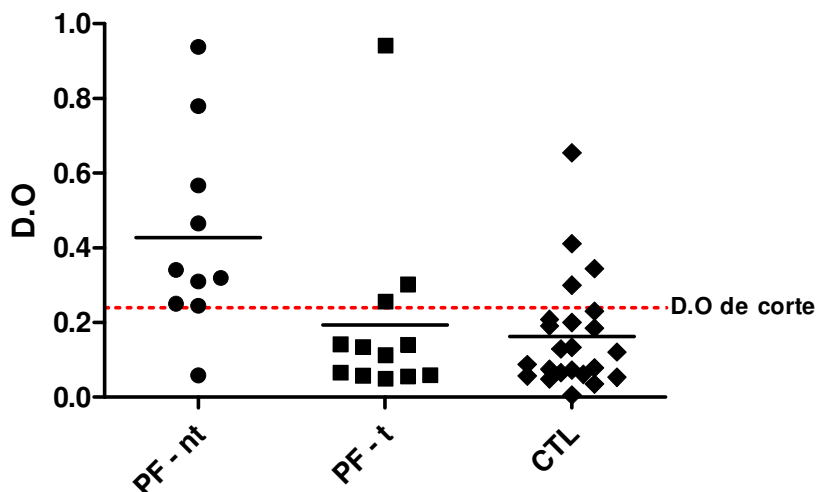
FIGURA 21 – REATIVIDADE HUMORAL GLOBAL À rDSG1 EM PACIENTES NÃO TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

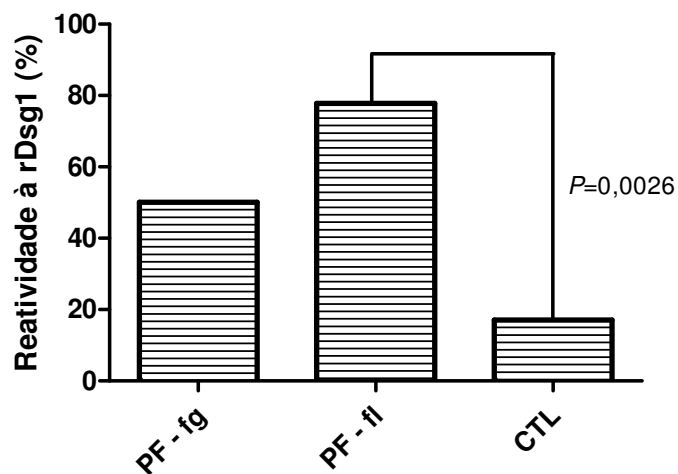
FIGURA 22 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA A rDSG1 DE PACIENTES NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; CTL: controles (indivíduos sadios).

FONTE: o autor (2009)

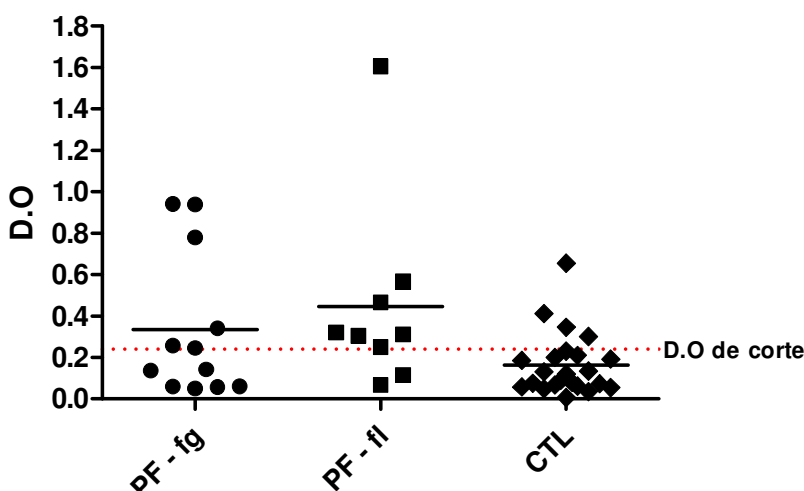
FIGURA 23 – REATIVIDADE HUMORAL À rDSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: PF – fg: pacientes com a forma generalizada de PF; PF – fl: pacientes com a forma localizada da doença; CTL: controles (indivíduos sadios).

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 24 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA A rDSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SÁDIOS



LEGENDA: PF – fg: pacientes com a forma generalizada de PF; PF – fl: pacientes com a forma localizada da doença; CTL: controles (indivíduos sadios).

FONTE: o autor (2009)

5.3 RESPOSTA HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SÍNÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1

A análise da resposta humoral aos peptídeos sintéticos da DSG1 foi realizada seguindo os mesmos parâmetros adotados para a análise do reconhecimento à rDSG1, com o agrupamento das amostras de soro dos pacientes com PF de acordo com seus históricos terapêutico e clínico.

Dos 14 peptídeos analisados, 5 foram diferencialmente reconhecidos quando o soro de pacientes não-tratados, pacientes em tratamento e indivíduos sadios foi comparado entre si (Figuras 25 e 26). As diferenças foram observadas para peptídeos correspondentes a sequências que compõem os segundo (EC2) e quinto (EC5) ectodomínios do autoantígeno em PF. A reatividade individual do soro de pacientes em tratamento e não-tratados e indivíduos sadios contra cada

peptídeo sintético da DSG1 analisados neste estudo encontra-se detalhado nas Figuras 27 e 28.

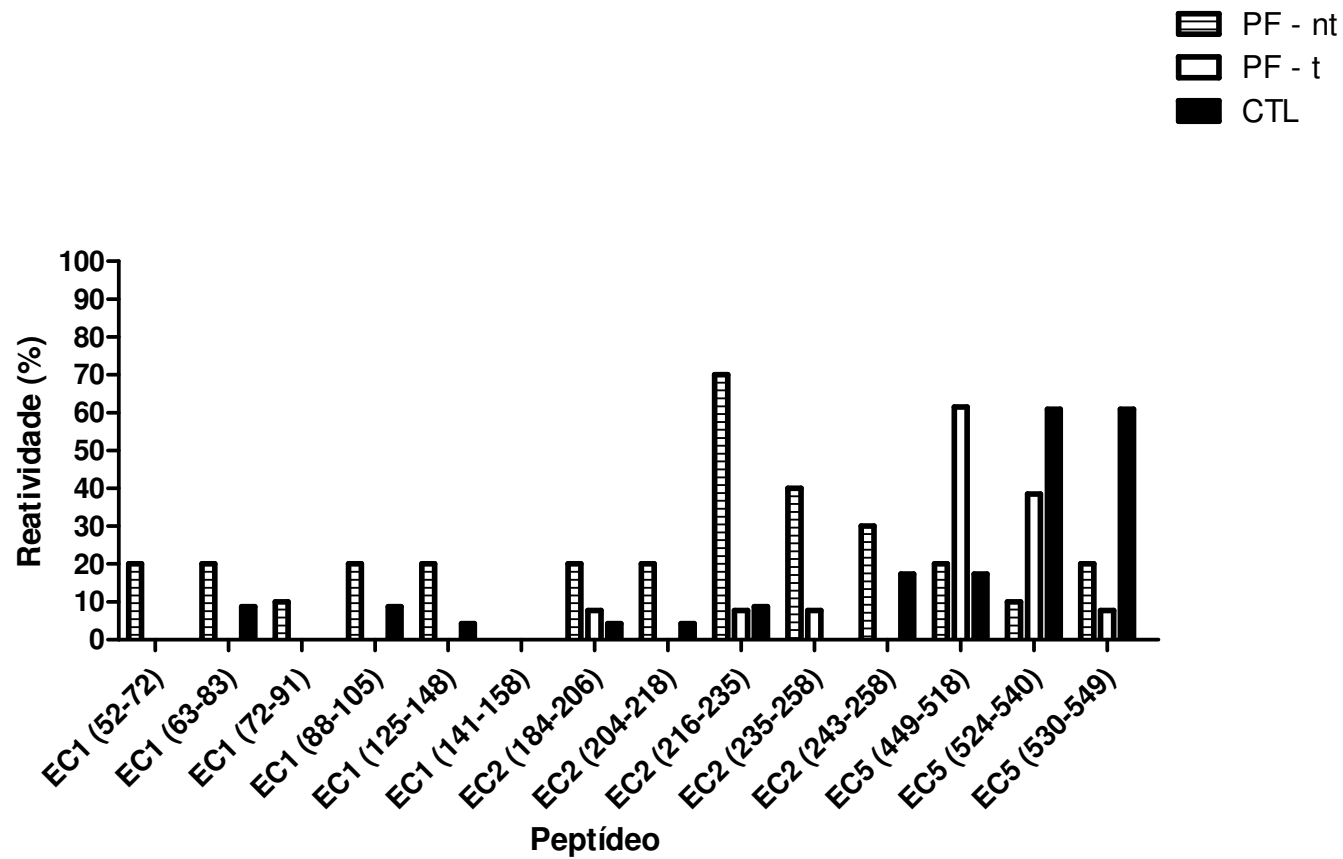
Os peptídeos EC2 (216-235) e EC2 (235-258) foram preferencialmente reconhecidos pelo grupo de pacientes não-tratados (70% e 40%, respectivamente). O reconhecimento do peptídeo EC2 (216-235) em pacientes não-tratados foi estatisticamente significativo tanto na comparação com o grupo de pacientes em tratamento ($P=0,0059$) como na comparação com o grupo composto por indivíduos sadios ($P=0,0008$). Já o peptídeo EC2 (235-258) apresentou padrão de reconhecimento preferencial quando comparado ao grupo de indivíduos sadios ($P=0,0051$) (Tabela 12).

O peptídeo EC5 (499-518) foi preferencialmente reconhecido no grupo de pacientes em tratamento (61,5%) quando comparado ao soro de indivíduos sadios (17,4%) apresentando $P=0,0011$ (Tabela 12).

O grupo composto de indivíduos sadios apresentou reconhecimento preferencial por 2 peptídeos do quinto domínio extracelular de DSG1. Ambos os peptídeos, EC5 (524-540) e EC5 (530-549), foram reconhecidos pelo soro de 60,9% dos indivíduos sadios analisados. O peptídeo EC5 (524-540) foi preferencialmente reconhecido por controles quando comparado ao grupo de pacientes não-tratados ($P=0,0094$). Já o peptídeo EC5 (530-549) apresentou reconhecimento preferencial em controles quando comparado a pacientes tratados ($P=0,0039$) (Tabela 12).

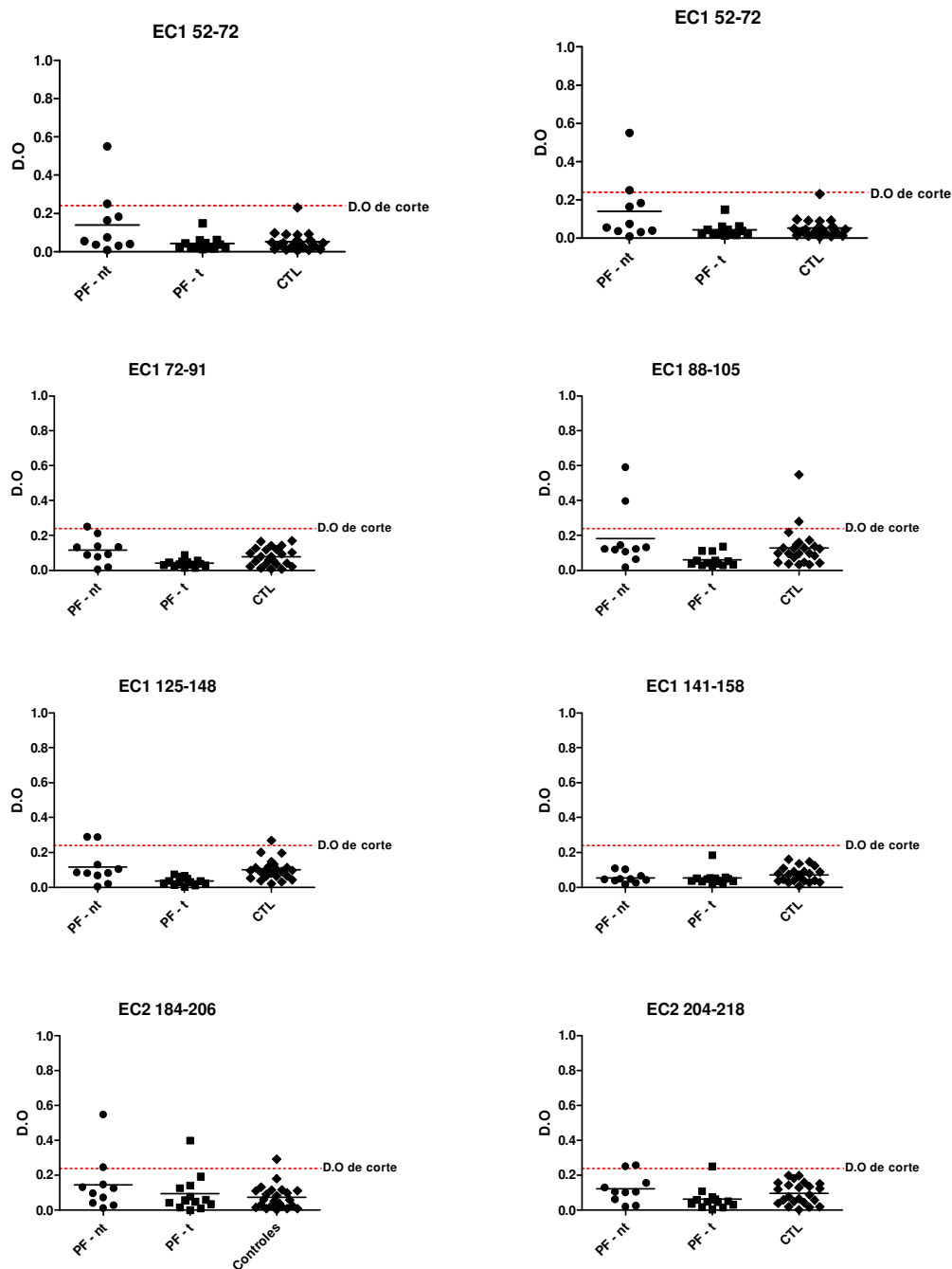
Com base nos dados acima descritos, elaboramos um mapa de reconhecimento preferencial da região estudada da DSG1, domínios extracelulares EC1, EC2 e EC5, por pacientes não tratados, em tratamento e controles sadios (Figura 29).

FIGURA 25 – REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SÍNÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SÁDIOS



LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; CTL: controles (indivíduos sadios)
 FONTE: o autor (2009)

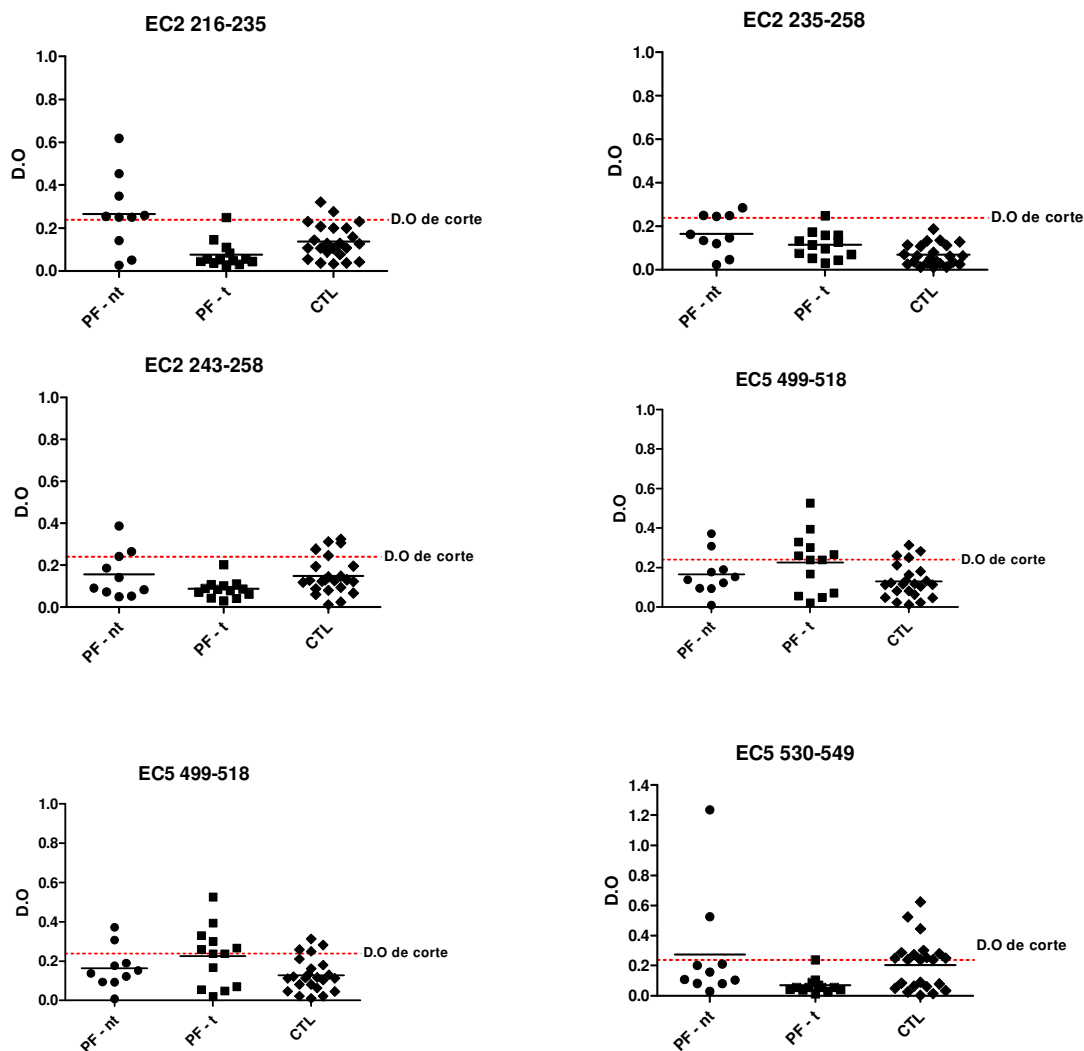
FIGURA 26 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 DE PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E CONTROLES SADIOS



LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 26 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL DETECTADA NOS ENSAIOS DE ELISA PARA OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 DE PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E CONTROLES SADIOS (CONTINUAÇÃO)



LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

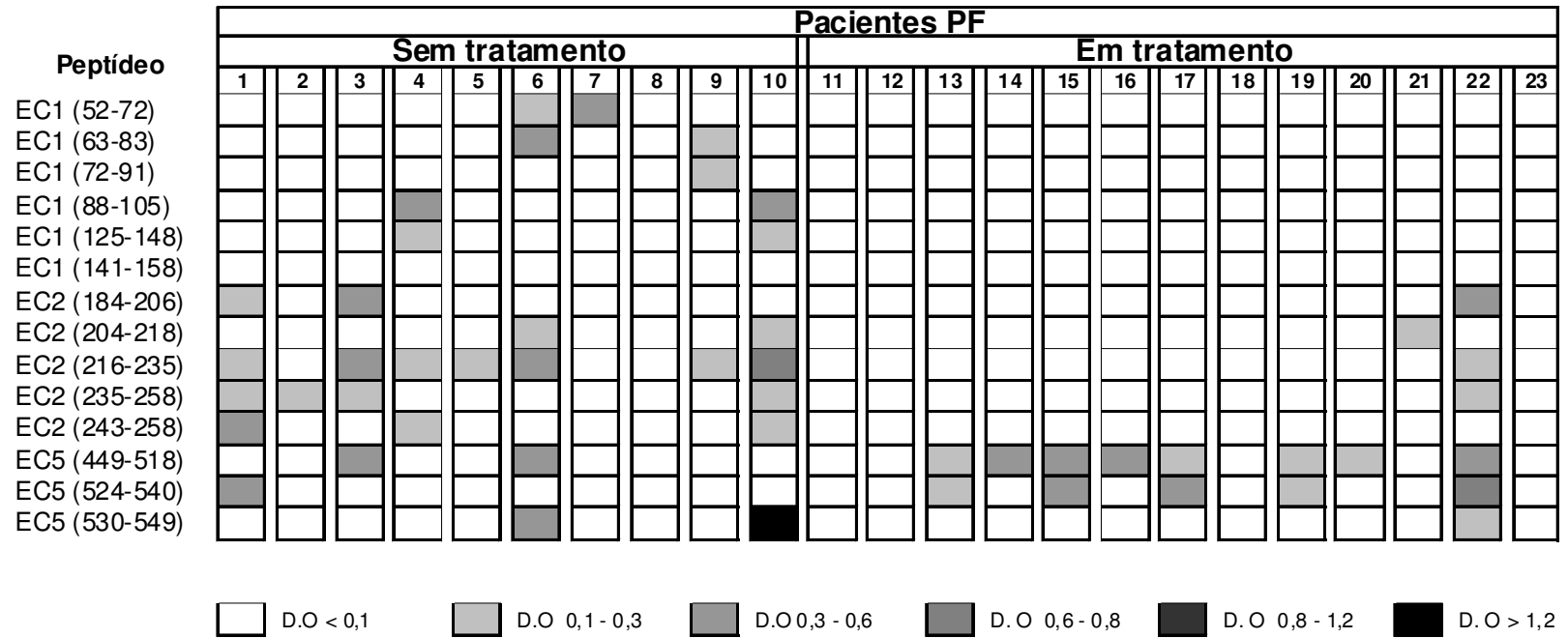
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS

Peptídeos	PF - nt n=10 %	PF - t n=13 %	Controles n=23 %
EC1 (52-72)	20,0	0,0	0,0
EC1 (63-83)	20,0	0,0	8,7
EC1 (72-91)	10,0	0,0	0,0
EC1 (88-105)	20,0	0,0	8,7
EC1 (125-148)	20,0	0,0	4,3
EC1 (141-158)	0,0	0,0	0,0
EC2 (184-206)	20,0	7,7	4,3
EC2 (204-218)	20,0	0,0	4,3
EC2 (216-235)	70,0 <i>P= 0,0059 vs PF - t; P= 0,0008 vs controles</i>	7,7	8,7
EC2 (235-258)	40,0 <i>P= 0,0051 vs controles</i>	7,7	0,0
EC2 (243-258)	30,0	0,0	17,4
EC5 (499-518)	20,0	61,5 <i>P= 0,0011 vs controles</i>	17,4
EC5 (524-540)	10,0	38,5	60,9 <i>P= 0,0094 vs PF - nt</i>
EC5 (530-549)	20,0	7,7	60,9 <i>P= 0,0039 vs PF t</i>

LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; controles: indivíduos sadios; em negrito: resposta encontra em apenas um dos grupos analisados no estudo.

FONTE: o autor (2009)

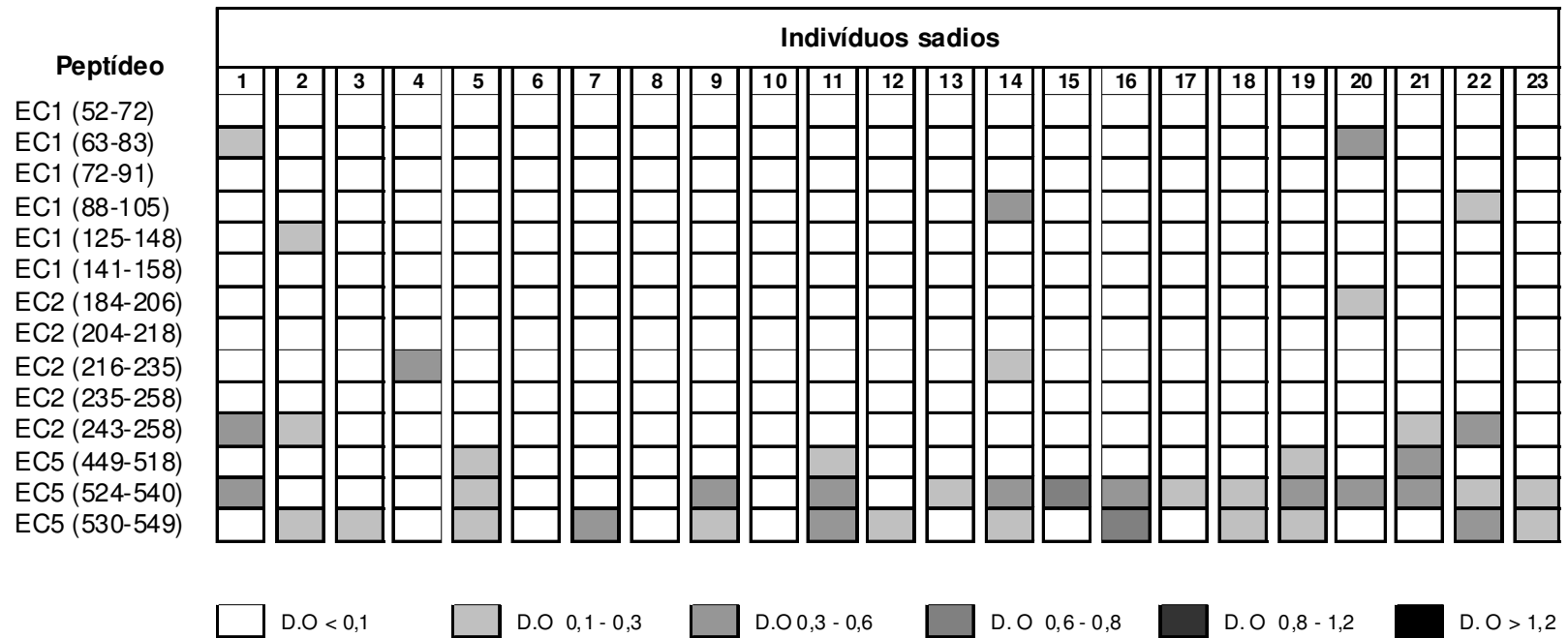
FIGURA 27 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL (DO) AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS E EM TRATAMENTO



NOTA: D.O de corte: 0,240

FONTE: o autor (2009)

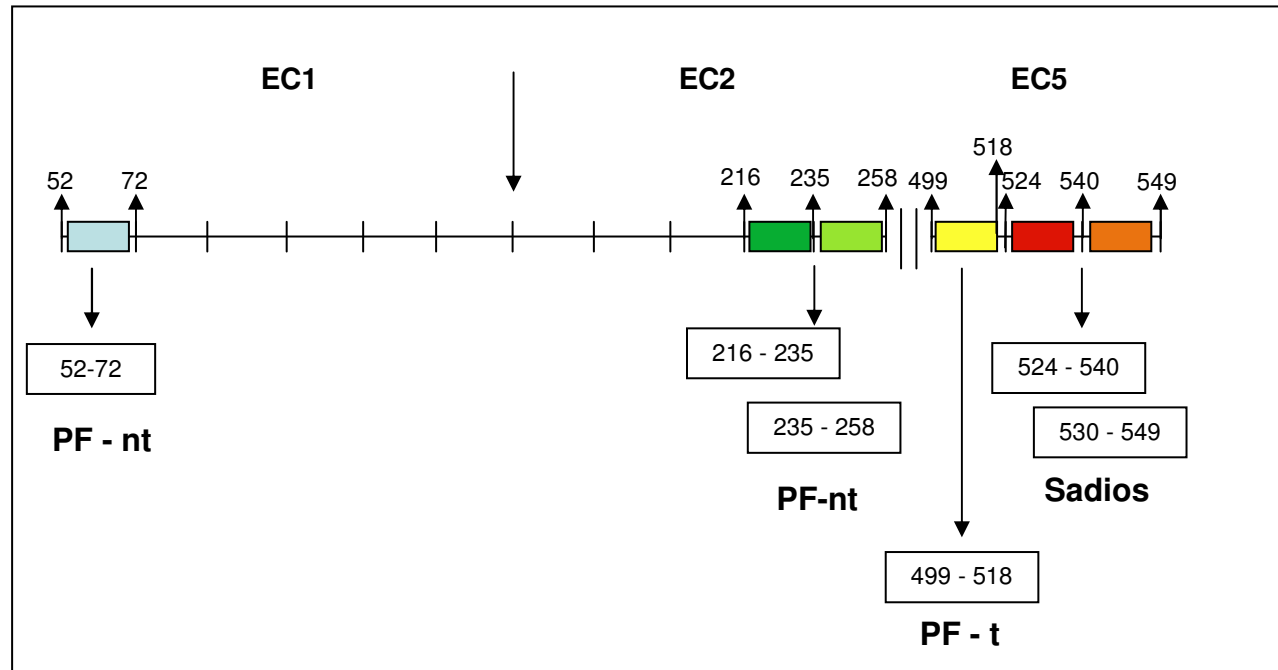
FIGURA 28 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL (DO) AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM INDIVÍDUOS SADIOS



NOTA: D.O de corte: 0,240

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 29 – MAPEAMENTO DA REATIVIDADE DE PACIENTES ANTES E PÓS-TRATAMENTO E DE INDIVÍDUOS SADIOS (CONTROLES)



LEGENDA: EC1: primeiro ectodomínio da proteína DSG1; EC2: segundo ectodomínio da proteína DSG1; EC5: quinto ectodomínio da proteína DSG1; PF-nt: pacientes com pênfigo foliáceo não tratados; PF-t: pacientes com pênfigo foliáceo em tratamento; Sadios: indivíduos sadios; Os números referem-se a posição de resíduos de aminoácidos dentro dos ectodomínios da proteína DSG1. Os números dentro das caixas referem-se aos peptídeos mapeados no presente estudo.

FONTE: o autor (2009)

Quando o soro dos mesmos pacientes com PF independentemente do tratamento foram analisados frente aos mesmos peptídeos e em função da manifestação das lesões, classificadas como forma localizada e forma generalizada da doença, e comparadas a indivíduos sadios, o reconhecimento preferencial manteve-se para 4 dos 5 peptídeos associados ao agrupamento por condição terapêutica descrito anteriormente. (Tabela 13). O resumo da reatividade do soro de pacientes com as formas localizada e generalizada de PF encontra-se detalhado na Figura 30.

Os peptídeos EC2 (216-235) e EC2 (235-258) foram preferencialmente reconhecidos pelo grupo de pacientes com a forma generalizada de PF (41% e 25%, respectivamente) quando comparado a reatividade desses no grupo composto por indivíduos sadios (8,7% e 0% para cada peptídeo, respectivamente). O valor de P para o peptídeo EC2 (216-235) foi 0,0331. Esse mesmo valor de P foi encontrado quando a reatividade do peptídeo EC2 (235-258) foi comparada entre pacientes com a forma generalizada de PF e controles sadios (Tabela 13).

Da mesma maneira que a análise anterior envolvendo pacientes não-tratados e em tratamento (Tabela 12), o grupo composto por indivíduos sadios apresentou reconhecimento preferencial por 2 peptídeos do quinto domínio extracelular de DSG1 quando comparado a pacientes com as formas localizada e generalizada de PF. Tanto o peptídeo EC5 (524-540) como o peptídeo EC5 (530-549) foram preferencialmente reconhecidos por controles sadios quando comparados ao grupo de pacientes com a forma generalizada da doença. Os valor de P obtido em ambas as análises foi 0,0039 (Tabela 13).

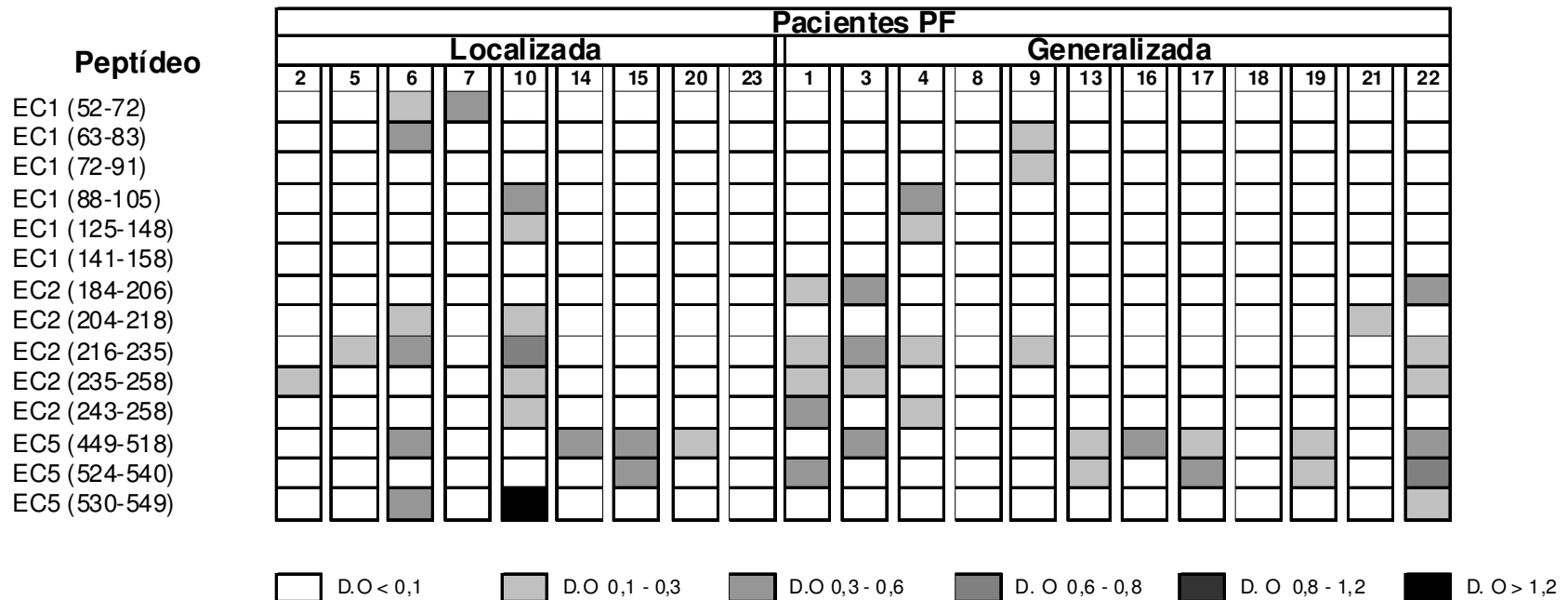
TABELA 13 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE HUMORAL DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS GENERALIZADA OU LOCALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS

Peptídeos	PF - fg n=12 %	PF - fl n=9 %	Controles n=23 %
EC1 (52-72)	0,0	22,2	0,0
EC1 (63-83)	8,3	11,1	8,7
EC1 (72-91)	8,3	0,0	0,0
EC1 (88-105)	8,3	11,1	8,7
EC1 (125-148)	8,3	11,1	4,3
EC1 (141-158)	0,0	0,0	0,0
EC2 (184-206)	25,0	0,0	4,3
EC2 (204-218)	8,3	22,2	4,3
EC2 (216-235)	41,7 <i>P = 0,0331 vs controles</i>	33,3	8,7
EC2 (235-258)	25,0 <i>P = 0,0331 vs controles</i>	22,2	0,0
EC2 (243-258)	16,7	11,1	17,4
EC5 (499-518)	50,0	44,4	17,4
EC5 (524-540)	41,7	22,2	60,9 <i>P = 0,0039 vs PF - fg</i>
EC5 (530-549)	8,3	22,2	60,9 <i>P = 0,0039 vs PF - fg</i>

LEGENDA: PF – fg: pacientes com a forma generalizada de PF; PF – fl: pacientes com a forma localizada de PF; CTL: controles (indivíduos sadios); em negrito: resposta encontra em apenas um dos grupos analisados no estudo.

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 30 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL (DO) AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF



LEGENDA: PF – fg: pacientes com a forma generalizada de PF; PF – fl: pacientes com a forma localizada de PF; CTL: controles (indivíduos saudáveis)

NOTAS: D.O de corte: 0,240; # 1 -10: não-tratados; # 13-23: tratados com imunossupressor.

FONTE: o autor (2009)

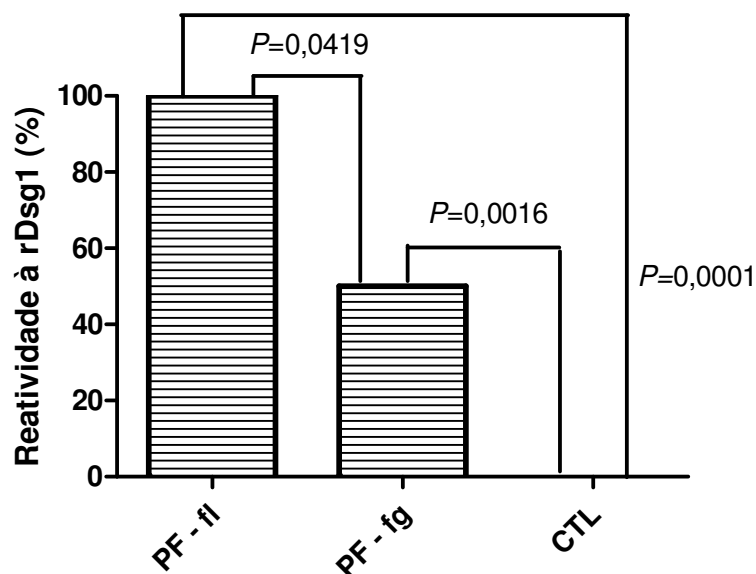
5.4 RESPOSTA CELULAR À PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 RECOMBINANTE (rDSG1) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

Para a análise da resposta celular à rDSG1, as amostras de CMSP dos pacientes também foram agrupadas de acordo com seus históricos terapêutico (indivíduos não-tratados e em tratamento) e clínico (forma localizada ou generalizada de PF).

Na primeira abordagem, foi analisada a capacidade de proliferação das CMSP frente a estímulo com a proteína recombinante, em pacientes em tratamento com corticosteróides ($n=13$), pacientes não-tratados ($n=9$) e indivíduos sadios ($n=23$). Enquanto 88,9% dos pacientes não-tratados responderam ao autoantígeno de pênfigo foliáceo, a mesma resposta foi obtida em 61,5% dos pacientes em tratamento, não sendo encontrada em indivíduos sadios (Figura 31). A rDSG1 foi preferencialmente reconhecida por LT de ambos os grupos de pacientes quando comparada ao reconhecimento obtido em indivíduos sadios ($P<0,0001$ e $P=0,0002$, respectivamente). Foram considerados responsivos à rDSG1 indivíduos cujas CMSP alcançaram I.E. $\geq 2,0$ (Figura 32).

Na sequência, foi analisada a capacidade de estímulo pela rDSG1 em CMSP de pacientes com as formas localizada ($n=8$) ou generalizada ($n=12$) de PF. Ambos os grupos incluíram pacientes em tratamento ou não-tratados. As CMSP responderam ao autoantígeno de PF em 100% dos pacientes com a forma localizada e em 50% dos pacientes com a forma generalizada da doença (Figura 33). Quando a resposta celular à rDSG1 encontradas nesses grupos foi comparada àquela encontrada em indivíduos sadios (0%), observou-se estímulo significativo com a proteína recombinante em ambos os grupos de pacientes ($P<0,0001$ e $P=0,0016$, para as formas localizada e generalizada, respectivamente). Foram considerados responsivos à rDSG1 indivíduos cujas CMSP alcançaram I.E. $\geq 2,0$ (Figura 34).

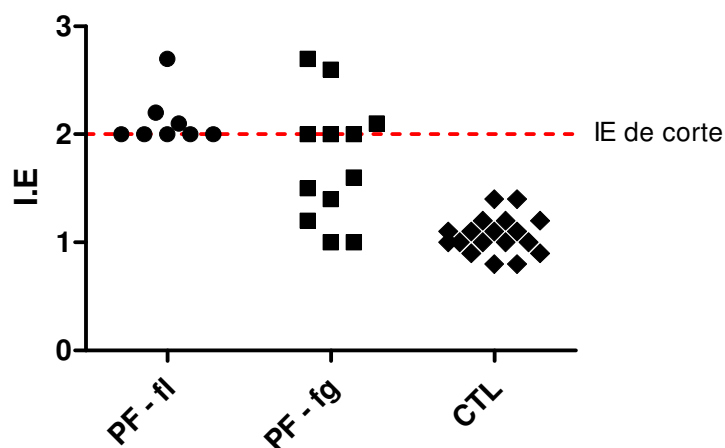
FIGURA 33 – FREQUÊNCIA DE RECONHECIMENTO DA rDSG1 POR PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: FL: pacientes com a forma localizada de PF; FG: pacientes com a forma generalizada de PF; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 34 – REATIVIDADE CELULAR INDIVIDUAL À rDSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS LOCALIZADA OU GENERALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: FL: pacientes com a forma localizada de PF; FG: pacientes com a forma generalizada de PF; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

5.5 RESPOSTA CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1

A análise da resposta celular aos peptídeos sintéticos da DSG1 foi realizada seguindo os mesmos parâmetros de agrupamento de amostras utilizados nas análises anteriores.

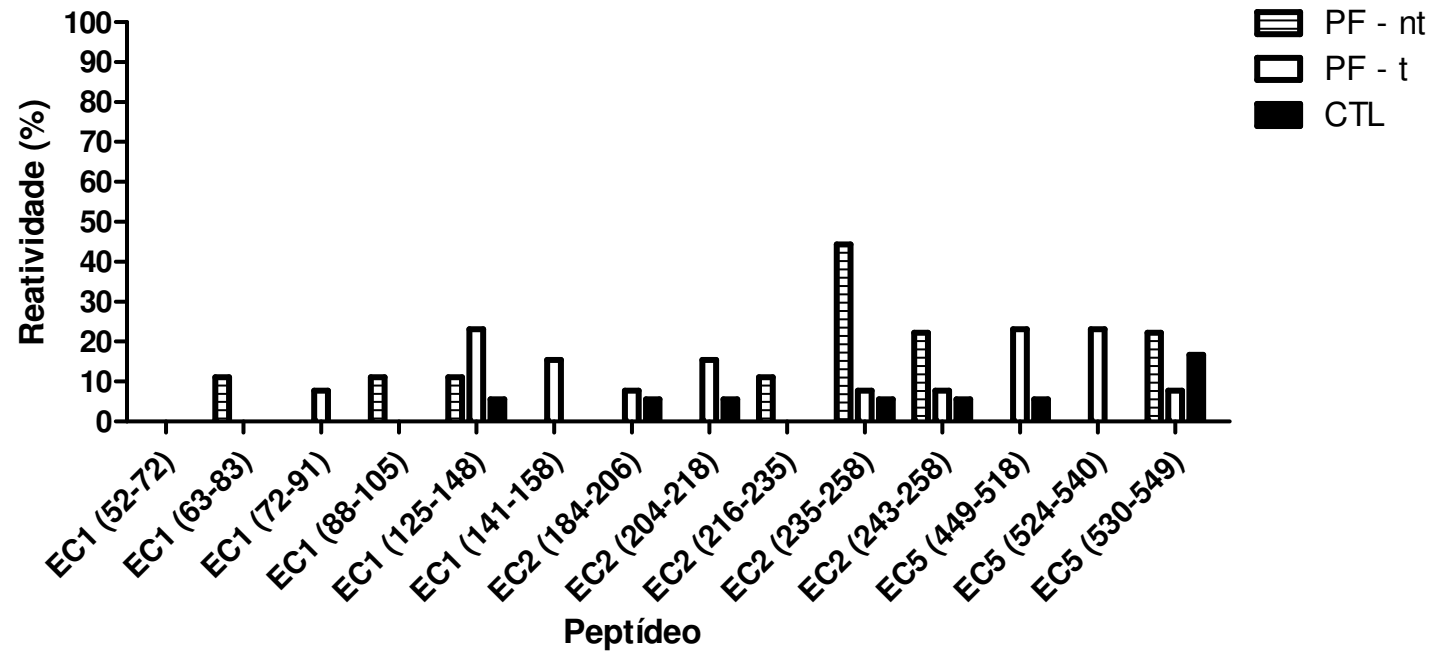
Dos 14 peptídeos analisados, apenas 1 foi diferencialmente reconhecido (Figura 35). O peptídeo EC2 (235-258) foi preferencialmente reconhecido pelo grupo de pacientes não-tratados (44,4%) quando comparado ao grupo de pacientes em tratamento (7,7%) e indivíduos sadios (5,5%), com $P=0,0297$ (Tabela 14).

Apesar da resposta celular aos demais peptídeos não diferir estatisticamente entre os grupos, observou-se um aumento na resposta dos peptídeos EC1 (72-91), EC1 (141-158) e EC5 (524-540) entre o grupo de pacientes em tratamento quanto comparados aos pacientes não-tratados (Tabela 14).

Já os peptídeos EC1 (125-148), EC2 (184-206), EC2 (204-218) e EC5 (499-518) induziram resposta celular tanto no grupo de pacientes em tratamento quanto em indivíduos sadios quando comparados aos pacientes não-tratados (Tabela 14).

Por outro lado, um aumento na resposta dos peptídeos EC1 (63-83), EC1 (88-105), EC2 (216-235) e EC2 (243-258) foi observado no grupo de pacientes não-tratados, quando comparados aos pacientes em tratamento e indivíduos sadios (Tabela 14).

FIGURA 35 – REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

TABELA 14 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS, EM TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS

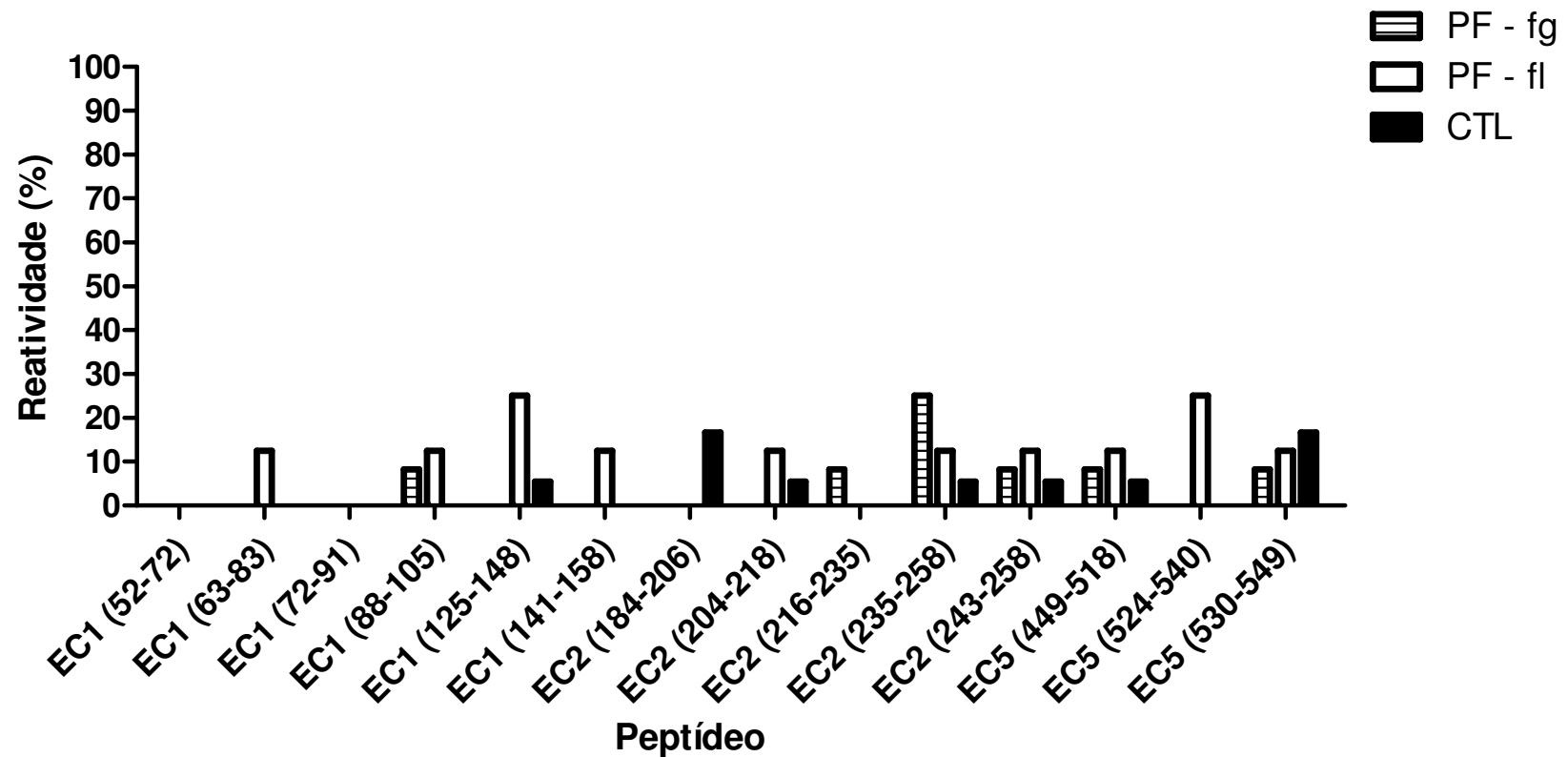
Peptídeos	PF - nt n=9 %	PF - t n=13 %	Controles n=23 %
EC1 (52-72)	0,0	0,0	0,0
EC1 (63-83)	11,1	0,0	0,0
EC1 (72-91)	0,0	7,7	0,0
EC1 (88-105)	11,1	0,0	0,0
EC1 (125-148)	11,1	23,1	5,5
EC1 (141-158)	0,0	15,4	0,0
EC2 (184-206)	0,0	7,7	5,5
EC2 (204-218)	0,0	15,4	5,5
EC2 (216-235)	11,1	0,0	0,0
EC2 (235-258)	44,4 <i>P = 0,0297 vs controles</i>	7,7	5,5
EC2 (243-258)	22,2	7,7	5,5
EC5 (499-518)	0,0	23,1	5,5
EC5 (524-540)	0,0	23,1	0,0
EC5 (530-549)	22,2	7,7	16,7

LEGENDA: PF – nt: pacientes não tratados; PF – t: pacientes em tratamento; controles: indivíduos sadios; em negrito: resposta encontra em apenas um dos grupos analisados no estudo.

FONTE: o autor (2009)

Quando os mesmos peptídeos foram analisados entre pacientes com a forma localizada de PF, pacientes com a forma generalizada da doença e indivíduos sadios, não houve reconhecimento preferencial estatisticamente significativo entre os grupos. O resumo da reatividade de cada peptídeo dentro de cada grupo analisado encontra-se detalhado na Figura 36.

FIGURA 36 – REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM PACIENTES COM AS FORMAS GENERALIZADA OU LOCALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: PF – fg: pacientes com a forma generalizada de PF; PF – fl: pacientes com a forma localizada de PF;
CTL: controles (indivíduos saudáveis)

FONTE: o autor (2009)

Observou-se um aumento na resposta aos peptídeos EC1 (63-83), EC1 (125-148), EC1 (141-158), EC2 (204-218), EC5 (499-518) e EC5 (524-540) no grupo de pacientes com a forma localizada de PF quando comparados aos pacientes com a forma generalizada e indivíduos sadios (Tabela 15).

Já os peptídeos EC2 (216-235) e EC2 (235-258) induziram resposta celular preferencial no grupo de pacientes com a forma generalizada de PF, quando comparados aos pacientes em tratamento e indivíduos sadios (Tabela 15).

O peptídeo EC5 (530-549) foi preferencialmente reconhecido por CMSP de indivíduos sadios (Tabela 15).

TABELA 15 – COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES COM AS FORMAS GENERALIZADA OU LOCALIZADA DE PF E INDIVÍDUOS SADIOS

Peptídeos	PF - fg n=12 %	PF - fl n=8 %	Controles n=18 %
EC1 (52-72)	0,0	0,0	0,0
EC1 (63-83)	0,0	12,5	0,0
EC1 (72-91)	0,0	0,0	0,0
EC1 (88-105)	8,3	12,5	0,0
EC1 (125-148)	0,0	25,0	5,5
EC1 (141-158)	0,0	12,5	0,0
EC2 (184-206)	0,0	0,0	5,5
EC2 (204-218)	0,0	12,5	5,5
EC2 (216-235)	8,3	0,0	0,0
EC2 (235-258)	25,0	12,5	5,5
EC2 (243-258)	8,3	12,5	5,5
EC5 (499-518)	8,3	12,3	5,5
EC5 (524-540)	0,0	25,0	0,0
EC5 (530-549)	8,3	12,5	16,7

LEGENDA: PF – fg: pacientes com a forma generalizada de PF; PF – fl: pacientes com a forma localizada de PF; CTL: controles (indivíduos sadios)

FONTE: o autor (2009)

5.6 RESPOSTA CELULAR À rDSG1 E AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM LINHAGENS E CLONES DE CMSP

Linhagens e “clones” (populações enriquecidas) de linfócitos T de sangue periférico foram derivados a partir de CMSP de pacientes não-tratados e pacientes em tratamento (Tabela 16). Na sequência, essas linhagens e “clones” foram analisados frente à capacidade de reconhecimento da rDSG1 e peptídeos sintéticos de EC1, EC2 e EC5 da proteína DSG1.

Nas linhagens de sangue periférico testadas, observou-se o reconhecimento preferencial do peptídeo EC2 (235-258), em linhagens previamente derivadas com um grupo de peptídeos contendo o peptídeo reconhecido (grupo de peptídeos G2, descrito previamente no item 4.7.1), em pacientes não-tratados, com os genótipos *HLA-DR 01/04* e *04/13*. A mesma resposta não foi observada para linhagens derivadas de CMSP de pacientes em tratamento (genótipos *HLA-DR 04/13*, *03/07* e *01/08*) (Figura 37).

Dos 10 “clones” derivados de linhagens G2 em diferentes pacientes, 3 reconheceram o peptídeo EC2 (235-258). O clone PF17.G2.1 (*HLA-DR 04/13*), derivado de CMSP de paciente em tratamento, reconheceu também a proteína rDSG1 (Figura 38).

TABELA 16 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS E CLONES DE LT DE CMSP OBTIDOS

Paciente	Lesão	Linhagem	População LT	"Clones" obtidos	Expansão	População LT	RCT $\alpha\beta/\gamma\delta$	RCT (V β)
PF1	G	G1	CD4 ⁺	PF1.G1.21	-			
				PF1.G1.28	-			
				PF1.G1.30	-			
		G2	CD4 ⁺	PF1.G2.1	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	2,5,6,7,10
				PF1.G2.22	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,7,10,12
				PF1.G2.27	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,3,5,12,13,17,20
		G3	CD4 ⁺	-				
PF2	L	G1	CD4 ⁺	PF2.G1.1	-			
				PF2.G1.3	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,5,6,8,9,10,11,12,17,18,20
		G2	CD4 ⁺	PF2.G2.1	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,5,7,9,11,17,23,24
				PF2.G2.4	-			
				PF2.G2.7	-			
		G3	CD4 ⁺	PF2.G3.4	-			
				PF2.G3.11	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	nt
PF3	G	G1	CD4 ⁺	PF3.G1.1	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,5,7,9,15,16,18,19,20,21,22
				PF3.G1.2	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,13,14,15,18,21,22,23,24
		G2	CD4 ⁺	PF3.G2.1	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,13,16,17,19,21
				PF3.G2.4	-			
				PF3.G2.5	-			
		G3	CD4 ⁺	-				
				-				

LEGENDA: pacientes 1-10: não tratados; L: forma localizada de PF; G: forma generalizada de PF; +: procedimento realizado com sucesso; - falha no procedimento; nt: procedimento não realizado.

FONTE: o autor (2009)

TABELA 16 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS E CLONES DE LT DE CMSP (CONTINUAÇÃO)

Paciente	Lesão	Linhagem	População LT	"Clones" obtidos	Expansão	População LT	RCT $\alpha\beta/\gamma^{\delta}$	RCT (V β)
PF17	G	G1	CD4 ⁺	PF17.G1.4	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,4,7,9,11,12,13,15,16,18,20,21,23,24
				PF17.G1.21	-			
				PF17.G1.28	-			
				PF17.G1.30	-			
		G2	CD4 ⁺	PF17.G2.1	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,6,7,8,9,11,17,20,21,22,23
				PF17.G2.2	-			
				PF17.G2.3	-			
				PF17.G2.4	-			
		G3	CD4 ⁺	PF17.G3.2	-			
		G1	CD4 ⁺	PF18.G1.14	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	todas as 24 famílias
PF18	G	G2	CD4 ⁺	PF18.G2.1	-	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	3,4,5,6,7,9,10,11,13,14,15,18,20
				PF18.G2.3	+			
				PF18.G2.4	-			
				PF18.G2.7	+			
		G3	CD4 ⁺	-	-		$\alpha\beta$	1,3,4,5,6,10,11,12,13,15,17,18,19,20,21,22,23
PF19	G	G1	CD4 ⁺	PF19.G1.5	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	nt
		G2	CD4 ⁺	PF19.G2.7	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	nt
				PF19.G2.8	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	todas as 24 famílias
		G3	CD4 ⁺	-				
		G1	CD4 ⁺	-				
PF20	L	G2	CD4 ⁺	-				
		G3	CD4 ⁺	-				

LEGENDA: pacientes 1-10: não tratados; L: forma localizada de PF; G: forma generalizada de PF; +: procedimento realizado com sucesso; - falha no procedimento; nt: procedimento não realizado.



FONTE: o autor (2009)

FIGURA 37 – RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR (IE) À rDSG1 E PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM LINHAGENS E “CLONES” DE LT DE SANGUE PERIFÉRICO

Peptídeo	Linhagens PBMC														
	PF01			PF02			PF03			PF17			PF18		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
rDsg1															
EC1 (52-72)															
EC1 (63-83)															
EC1 (72-91)															
EC1 (88-105)															
EC1 (125-148)															
EC1 (141-158)															
EC2 (184-206)															
EC2 (204-218)															
EC2 (216-235)															
EC2 (235-258)															
EC2 (243-258)															
EC5 (449-518)															
EC5 (524-540)															
EC5 (530-549)															

Peptídeo	Clones PBMC									
	PF01			PF02			PF03			PF17
	1.G2.1	1.G2.22	1.G2.27	2.G1.3	2.G2.1	2.G3.11	3.G1.1	3.G1.2	3.G2.1	17.G1.4
rDsg1										
EC1 (52-72)										
EC1 (63-83)										
EC1 (72-91)										
EC1 (88-105)										
EC1 (125-148)										
EC1 (141-158)										
EC2 (184-206)										
EC2 (204-218)										
EC2 (216-235)										
EC2 (235-258)										
EC2 (243-258)										
EC5 (449-518)										
EC5 (524-540)										
EC5 (530-549)										

Legenda

	I.E < 2,0
	I.E ≥ 2,0

LEGENDA: PF01/PF02/PF03: pacientes com PF não-tratados; PF17/PF18/PF19: pacientes PF em tratamento; linhagem G1: peptídeos: EC1 (72-91), EC1 (88-105), EC1 (141-158), EC2 (184-206); linhagem G2: peptídeos: EC2 (216-235), EC2 (235-258), EC2 (243-258), EC5 (524-540), EC5 (499-518); linhagem G3: peptídeos: EC1 (52-72), EC1 (63-83), EC5 (539-549).

FONTE: o autor (2009)

5.7 RESPOSTA CELULAR À rDSG1 E AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DO PRIMEIRO, SEGUNDO E QUINTO ECTODOMÍNIOS DA PROTEÍNA DESMOGLEÍNA 1 EM LINHAGENS E CLONES DE BIÓPSIA DE PELE

Linhagens e “clones” (populações enriquecidas) de linfócitos T infiltrantes de biópsia de pele foram derivados a partir de biópsias coletadas em pacientes com lesões ativas de pacientes em tratamento (Tabela 17). Na sequência, essas linhagens e “clones” foram analisados com relação à capacidade de reconhecimento da rDSG1 e peptídeos sintéticos de EC1, EC2 e EC5 da proteína DSG1.

Nas linhagens de LT infiltrantes, observou-se o reconhecimento preferencial do peptídeo EC2 (235-258), em 2 das 4 linhagens obtidas (PF13 e PF15, genótipos *HLA-DR 01/14* e *01/04*). O peptídeo EC5 (499-518) foi reconhecido pela linhagem PF16 ($1^+/4$), com genótipo *HLA-DR 01/15*. A linhagem PF14 (*HLA-DR 04/07*) não reconheceu nenhum peptídeo (Figura 39). Essa linhagem, ao contrário das demais, é composta por cerca de 91% de LT CD8⁺ (Tabela 17).

Dos “clones” de LT derivados dessas linhagens, 2 clones ($2^+/12$), ambos derivados da linhagem PF13, reconheceram peptídeos do primeiro e segundo ectodomínios de DSG1 (Figura 38). Nenhuma linhagem ou “clone” analisado reconheceu a proteína rDSG1.

TABELA 17 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS E CLONES DE LT INTRALESIONAIS

Paciente	Lesão	Linhagem	População LT	"Clones" obtidos	Expansão	População LT	RCT $\alpha\beta/\gamma^{\delta}$	RCT (V β)
PF13	G	Intralesional	CD4 ⁺	PF13.7	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	todas as 24 famílias
				PF13.8	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,5,7,8,10,15
				PF13.11	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,4,5,6,7,8,9,12,13,14,17,20,21,22
				PF13.13	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,4,5,6,7,8,9,14,15,17,18,21,22,23
				PF13.14	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,3,5,7,8,10,12,13,14,15,17,18,20,21,23
				PF13.18	-			
				PF13.24	-			
PF14	L	Intralesional	CD8 ⁺	PF14.1	+	NT	nt	NT
				PF14.2	+	NT	nt	NT
				PF14.5	-			
PF15	L	Intralesional	CD4 ⁺	PF15.1	+	NT	nt	NT
				PF15.3	+	NT	nt	NT
PF16	G	Intralesional	CD4 ⁺	PF16.1	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19
				PF16.3	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	todas as 24 famílias
				PF16.6	+	CD4 ⁺	$\alpha\beta$	todas as 24 famílias

LEGENDA: pacientes 13-16: em tratamento; L: forma localizada de PF; G: forma generalizada de PF; +: procedimento realizado com sucesso; - falha no procedimento; nt: procedimento não realizado.

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 38 – RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR (IE) À rDSG1 E PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM LINHAGENS E “CLONES” DE LT INFILTRANTES DE BIÓPSIA DE PELE

Peptídeo	Linhagem Biópsia				Clones biópsia											
	PF	PF	PF	PF	PF13					PF14		PF15		PF16		
	13	14	15	16	13.7	13.8	13.11	13.13	13.14	14.1	14.2	15.1	15.3	16.1	16.3	16.6
EC1 (52-72)																
EC1 (63-83)																
EC1 (72-91)																
EC1 (88-105)																
EC1 (125-148)																
EC1 (141-158)																
EC2 (184-206)																
EC2 (204-218)																
EC2 (216-235)																
EC2 (235-258)																
EC2 (243-258)																
EC5 (449-518)																
EC5 (524-540)																
EC5 (530-549)																
rDsg1																

LEGENDA:

I.E < 2,0

I.E ≥ 2,0

5.8 ANÁLISE CONJUNTA DA REATIVIDADE HUMORAL E CELULAR NOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS

A análise conjunta da capacidade de resposta humoral e celular por grupo foi realizada com o objetivo de verificar o perfil de reatividade entre os tipos de respostas dentro de cada grupo estudado. Assim, foram realizadas análises comparativas da reatividade humoral e celular dentro do grupo de pacientes não-tratados e em tratamento, pacientes com a forma localizada ou generalizada da doença e indivíduos saudáveis.

Os peptídeos EC1 (52-72), EC2 (184-206), EC5 (499-518) e EC5 (524-540) foram reconhecidos por anticorpos de cerca de 20% dos pacientes não-tratados. Já os peptídeos com sequências sobrepostas, EC2 (216-235) e EC2 (235-258), foram reconhecidos por 70% e 40% dos pacientes não-tratados, respectivamente.

A proteína recombinante (rDSG1) foi reconhecida por autoanticorpos e células de forma semelhante (90 e 88,9%, respectivamente). Os peptídeos EC1 (63-83), EC1 (88-105), EC1 (125-148) desencadearam resposta humoral e celular em 20% e 11,1% dos pacientes não tratados, respectivamente. Também foram encontradas respostas humoral e celular para os seguintes peptídeos: EC2 (235-258) 40% e 44,4%, EC2 (243-258) 30% e 22,2% e o peptídeo EC5 (530-549) 20% e 22,2%, respectivamente (Figura 39). O peptídeo EC1 (141-158) não desencadeou resposta celular e/ou humoral em nenhum paciente não-tratado. O perfil da resposta humoral e celular no grupo de pacientes não tratados está mostrado na Figura 39. É interessante notar que alguns peptídeos foram reconhecidos somente por anticorpos: EC1 (52-72), EC1 (72-91), EC2 (184-206), EC2 (204-218), EC2 (216-235), EC5 (499-518) e EC5 (524-540) (Figura 39). Isso se deve, em parte, ao fato da doença ter resposta imune do perfil Th1, sendo mediada por autoanticorpos.

No grupo de pacientes em tratamento foi encontrada somente resposta celular para os peptídeos EC1 (72-91), EC1 (125-148), EC1 (141-158), EC2 (204-218) e EC2 (243-258) para cerca de 25% dos pacientes. O contrário ocorreu com o peptídeo EC2 (216-235), para o qual só foi encontrada resposta humoral (7,7%

dos pacientes) (Figura 40).

A reatividade celular para rDSG1 foi encontrada com maior frequência (61,5%) do que a resposta humoral (31%), no grupo de pacientes em tratamento. Os peptídeos EC2 (184-206), EC2 (235-258) e EC5 (530-549) apresentaram ambas as respostas na mesma porcentagem de pacientes (7,7%). Para dois peptídeos do quinto domínio extracelular de DSG1, EC5 (499-518) e EC5 (524-540), foi observada resposta humoral em maior proporção para pacientes em tratamento (61,5% e 38,5%, respectivamente) quando comparada a resposta celular (23,1% para ambos os peptídeos) (Figura 40). Os peptídeos EC1 (52-72), EC1 (63-83) e EC1 (88-105) não desencadearam resposta celular e/ou humoral em nenhum paciente em tratamento.

A reatividade celular para rDSG1 foi encontrada com maior frequência (100%) quando comparada à resposta humoral (77%) no grupo de pacientes com a forma localizada da doença. Os peptídeos EC1 (63-83), EC1 (88-105) EC1 (125-148), EC2 (204-218), EC2 (235-258) EC2 (243-258), EC5 (524-540) e EC5 (530-549) apresentaram ambas as respostas em torno de 22% dos pacientes. Para o peptídeo EC5 (499-518) foi observada resposta humoral em um maior número de pacientes (44,4%) quando comparada a resposta celular para esse peptídeo (12,5% dos pacientes) (Figura 41). Em pacientes com a forma localizada de PF foi encontrada somente resposta celular para o EC1 (141-158) em 12,5% dos pacientes analisados. O contrário ocorreu com os peptídeos EC1 (52-72) e EC2 (216-235), para o qual só foi encontrada resposta humoral (20% e 33,3% dos pacientes, respectivamente) (Figura 41). O peptídeo EC2 (184-206) não desencadeou resposta celular e/ou humoral em nenhum paciente com a forma localizada de PF.

Em pacientes com a forma generalizada de PF, a reatividade celular para rDSG1 foi igual à reatividade humoral (50% dos pacientes). Os peptídeos EC1 (63-83), EC1 (72-91), EC1 (125-148) e EC2 (204-218) foram apenas reconhecidos por anticorpos em 8,3% dos pacientes. Já os peptídeos EC2 (184-206) e EC5 (524-540) foram reconhecidos por anticorpos de 25% e 41,7% dos pacientes, respectivamente (Figura 42).

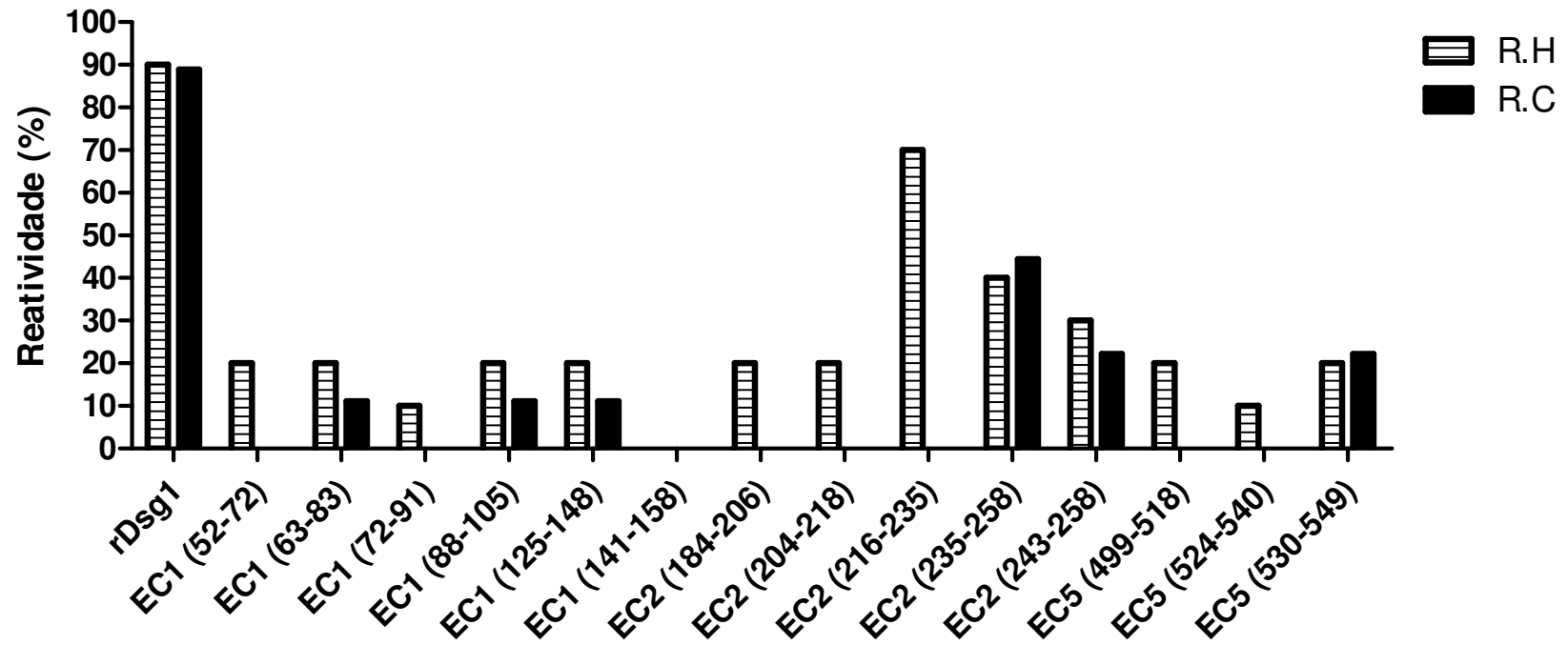
Os peptídeos EC1 (88-105), EC2 (235-258), EC2 (243-258) e EC5 (530-549) apresentaram ambas as respostas em 25% dos pacientes. Para os peptídeos EC2 (216-235) e EC5 (499-518) foi observada resposta humoral em maior proporção de pacientes (41,7% e 50%, respectivamente) quando comparada a resposta celular (8,3% para ambos os peptídeos) (Figura 42). Os peptídeos EC1 (52-72) e EC1 (141-158) não desencadearam resposta celular e/ou humoral em nenhum paciente com a forma generalizada de PF.

Em indivíduos saudáveis, a reatividade humoral à rDSG1 foi de 17%, não sendo detectada resposta celular (Figura 43). A resposta humoral esteve presente em 8,7% dos indivíduos saudáveis para os peptídeos EC1 (63-83), EC1 (88-105) e EC2 (216-235) e em 60,9% para o peptídeo EC5 (524-540). Para o peptídeo EC2 (235-258) foi encontrada somente reatividade celular (5,5% indivíduos saudáveis) (Figura 43).

Os peptídeos EC1 (125-148), EC2 (184-206), EC2 (204-218), EC2 (243-258) e EC5 (499-518) apresentaram ambas as respostas em 17,4% dos indivíduos saudáveis. Para o EC5 (530-549) foi observada resposta humoral em um maior número de pacientes (60,9%) quando comparado à resposta celular para esse peptídeo (16,7%) (Figura 43). Os peptídeos EC1 (52-72), EC1 (72-91) e EC1 (141-158) não desencadearam resposta celular e/ou humoral em nenhum indivíduo saudável.

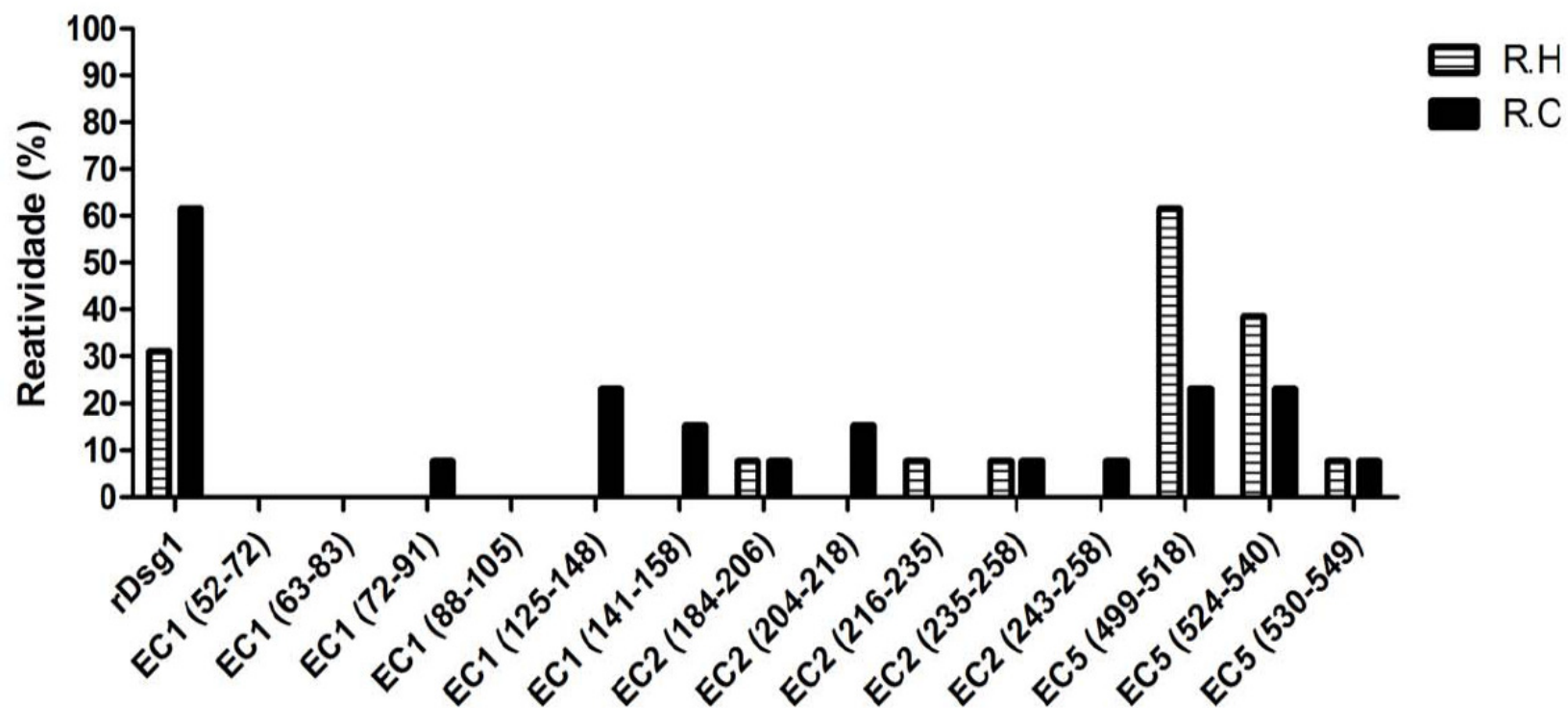
Também foi realizada a análise conjunta das respostas celular e humoral ao peptídeo EC2 (235-248) em pacientes com PF em tratamento e não tratados e com ou sem lesões. O mapeamento da reatividade humoral e celular periférica e intralesional a esse epítipo está mostrado na Tabela 18.

FIGURA 39 – PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES PF NÃO-TRATADOS



LEGENDA: R.H: resposta humoral; R.C: resposta celular.
 FONTE: o autor (2009)

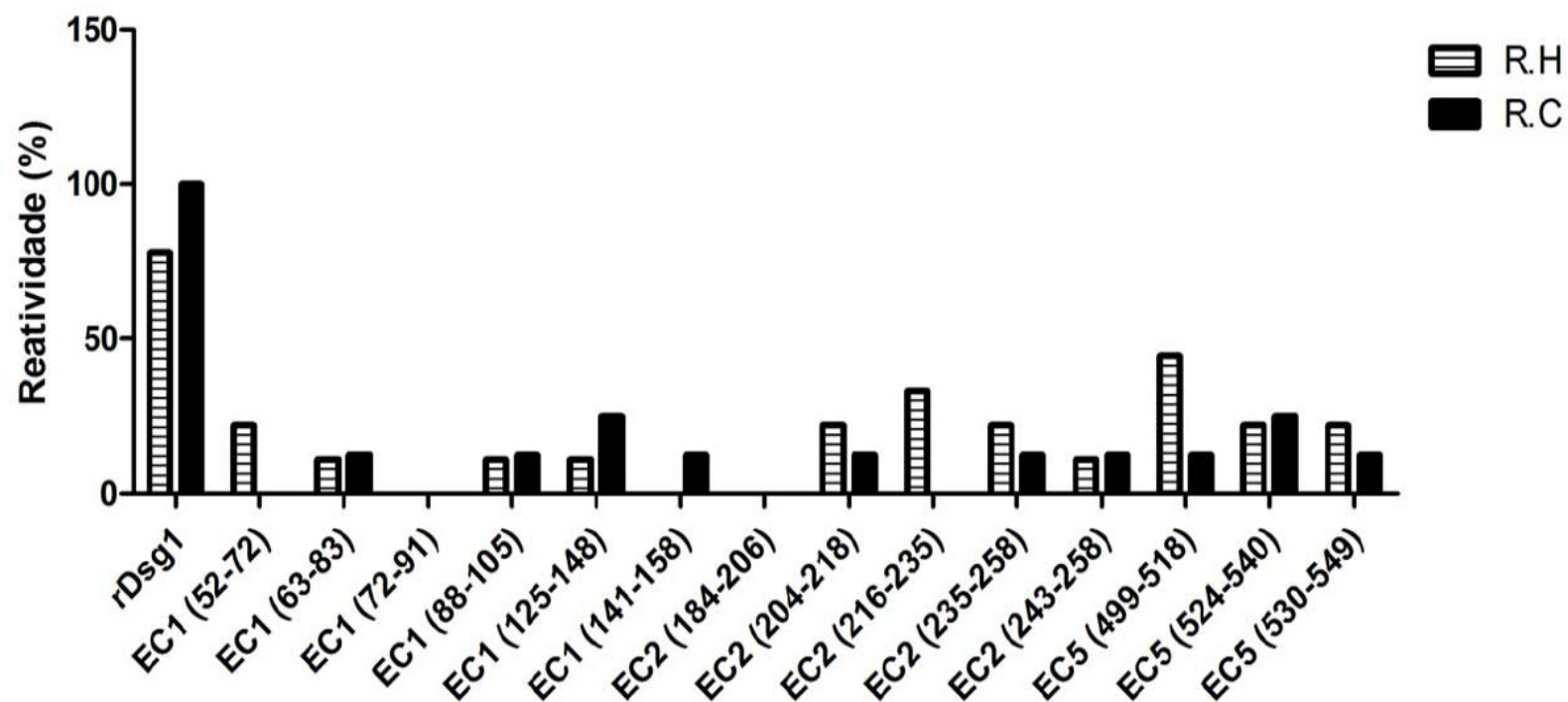
FIGURA 40 – PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES PF EM TRATAMENTO



LEGENDA: R.H: resposta humoral; R.C: resposta celular.

FONTE: o autor (2009)

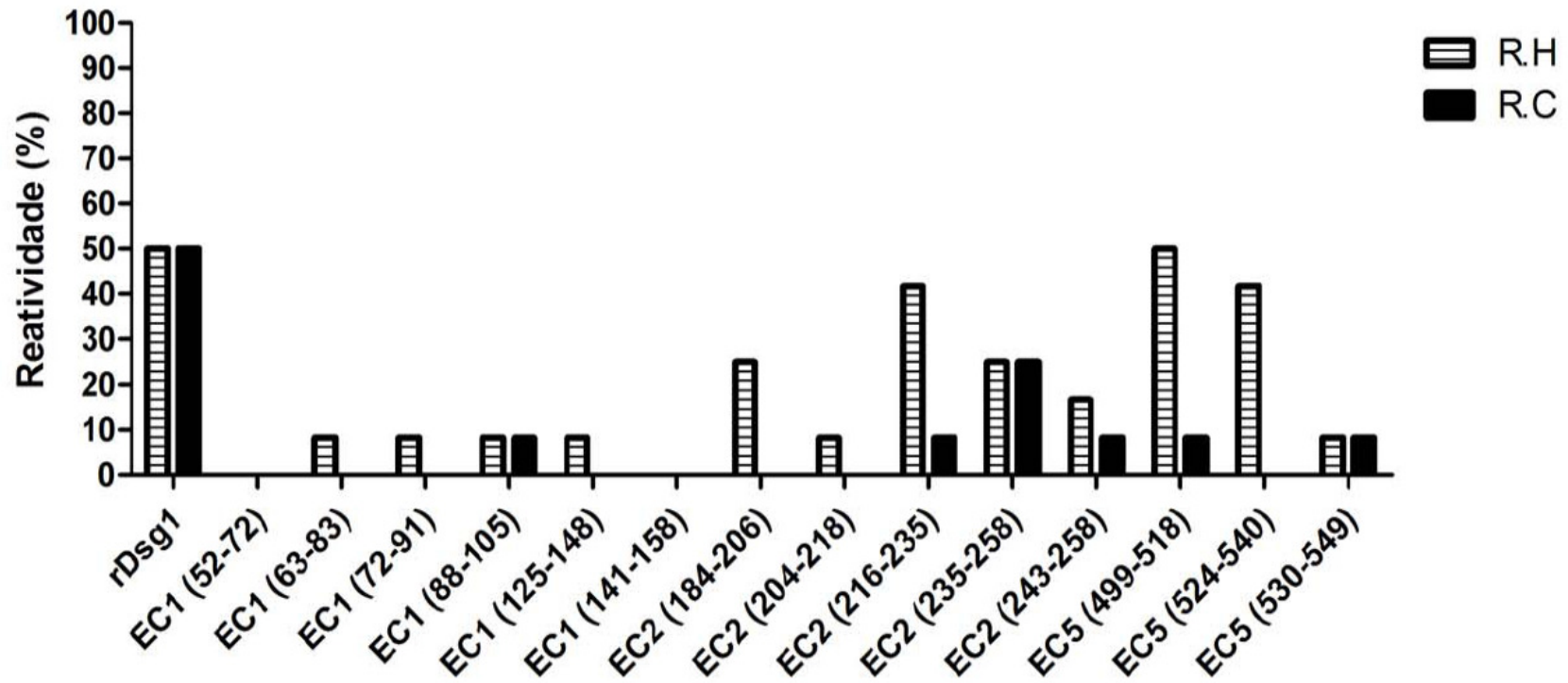
FIGURA 41 – PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES COM A FORMA LOCALIZADA DE PF



LEGENDA: R.H: resposta humoral; R.C: resposta celular.

FONTE: o autor (2009)

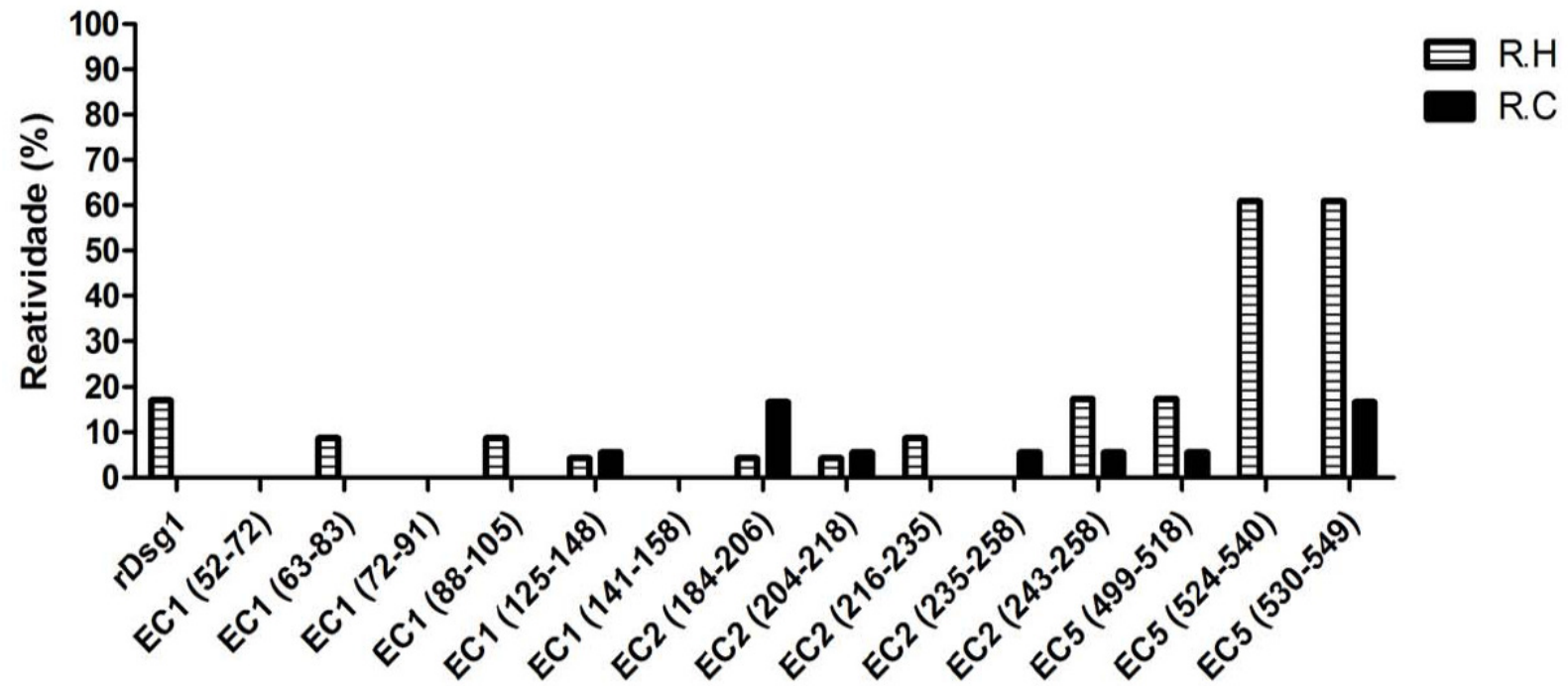
FIGURA 42 – PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM PACIENTES COM A FORMA GENERALIZADA DE PF



LEGENDA: R.H: resposta humoral; R.C: resposta celular.

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 43 – PERFIL DAS RESPOSTAS HUMORAL E CELULAR EM INDIVÍDUOS SADIOS



LEGENDA: R.H: resposta humoral; R.C: resposta celular.
 FONTE: o autor (2009)

TABELA 18 – RESUMO DA REATIVIDADE AO PEPTÍDEO IMUNODOMINANTE EC2 (235-258)

DSG1 - EC2 (235-258)									
Genótipo PF	SU/SU			SU/NE				SU/PRO	PRO/PRO
Paciente	PF1	PF4	PF15	PF2	PF11	PF17	PF13	PF3	PF18
<i>HLA-DRB1</i>	<i>0102/04</i>	<i>0102/04</i>	<i>0102/0411</i>	<i>04/1301</i>	<i>0102/0302</i>	<i>0102/16</i>	<i>01/14</i>	<i>04/1103</i>	<i>0301/0701</i>
Lesões	FG	FG	FL	FL	-	FG	FG	FG	FG
Tratamento	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Resposta Celular									
PBMC	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Linhagem PBMC	+			+		-		+	-
Clone PBMC	+			+		+		-	-
Linhagem intralesional			+				+		
Clone intralesional			-				+		
Resposta humoral									
Soro	+	+	-	+	-	-	-	+	-

LEGENDA: SU- alelo de susceptibilidade; PRO- alelo de proteção; NE- alelo neutro

FONTE: o autor (2009)

5.9 RELAÇÃO ENTRE REATIVIDADE HUMORAL E CELULAR E GENÓTIPOS *HLA-DRB1* ASSOCIADOS A PF

Como descrito anteriormente por nosso grupo, os alelos *HLA-DRB1* *0101, *0102, *0103, *0404, *0406, *0410 e *1406 apresentam associação positiva com PF, enquanto os alelos *HLA-DRB1* *0301, *0701 e *0801, estão associados de forma negativa à doença (PAVONI e cols., 2003). Através da análise das diferentes genótipos foi demonstrado que a interação entre alelos de resistência, susceptibilidade e neutros desviam-se claramente do modelo co-dominante (tabela 19).

TABELA 19 – INTERAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE ALELOS *HLA-DRB1* ASSOCIADOS AO PF

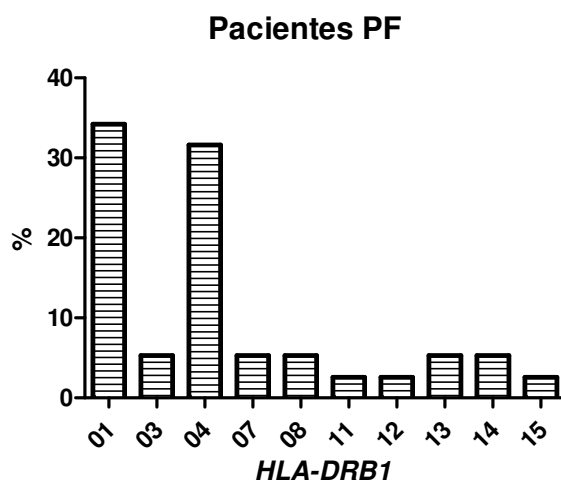
Genótipo	OR	P	Observações
SU/SU	8,7	$<10^{-6}$	Homozigotos SU/SU: risco mais elevado em relação aos heterozigotos SU/NE (p=0,012)
SU/NE	4,0	$<10^{-6}$	Dominância incompleta (efeito de dose) de alelos SU em relação aos NE.
PRO/PRO	0,07	$<10^{-6}$	PRO/PRO e PRO/NE estão igualmente protegidos (p=0,95)
PRO/NE	0,05	$<10^{-6}$	Conclui-se que os alelos PRO são dominantes em relação aos NE
SU/PRO	1,0		Semi-dominância dos alelos SU e PRO

LEGENDA: SU: alelos *HLA-DRB1* associados à maior susceptibilidade ao PF; PRO: alelos *HLA-DRB1* associados à maior resistência ao PF; NE: alelos *HLA-DRB1* neutros

FONTE: adaptado de (PAVONI e cols., 2003).

Na figura 44 estão mencionadas as frequências relativas dos alelos *HLA-DRB1* encontrados na amostra de pacientes desse estudo.

FIGURA 44 – FREQUÊNCIA DE ALELOS *HLA-DR* NA AMOSTRA DE PACIENTES COM PF ESTUDADA



FONTE: o autor (2009)

Para realizar uma análise comparativa entre a resposta humoral e celular encontradas no presente estudo e a interação entre alelos que compõem os genótipos *HLA-DRB1* de susceptibilidade e resistência ao PF, agrupamos os genótipos de acordo com a classificação apresentada na Tabela 20.

TABELA 20 – CLASSIFICAÇÃO DOS ALELOS ASSOCIADOS À SUSCEPTIBILIDADE/ RESISTÊNCIA AO PF DE ACORDO COM O CRITÉRIO 3 DE PAVONI E COLS. (2003).

Alelo <i>HLA-DR</i>	Classificação
01	SU
03	* NE
04	SU
07	PRO
08	PRO
11	PRO
12	NE
13	NE
14	NE
15	NE

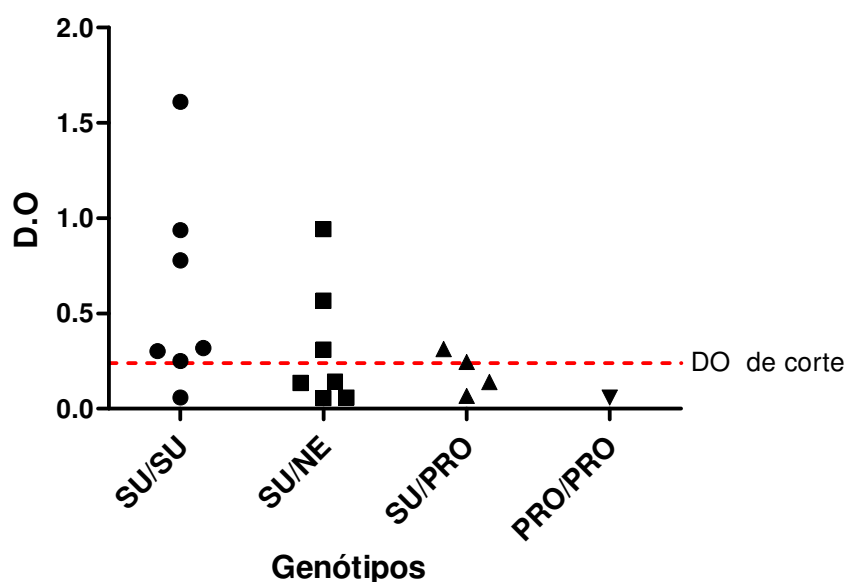
LEGENDA: SU: susceptibilidade; PRO: proteção; NE: neutro

NOTA: * alelo *HLA-DRB1* *0301 confere susceptibilidade ao PF

FONTE: o autor (2009)

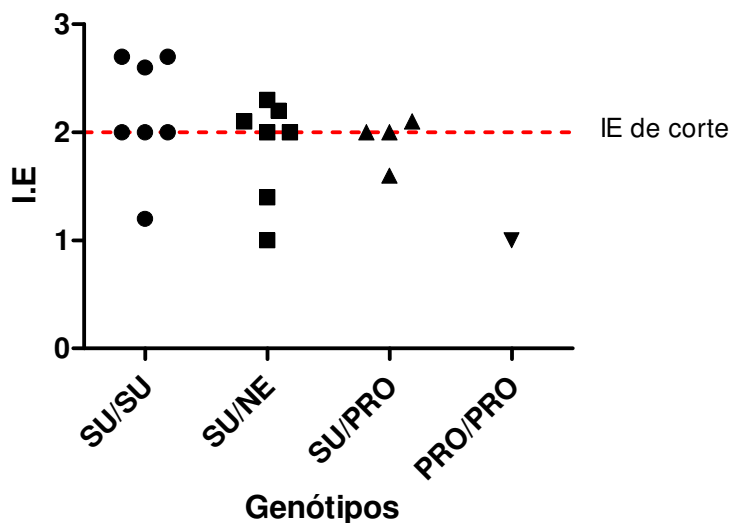
Ao analisarmos os gráficos de reatividade humoral individual dos pacientes com pênfigo foliáceo, percebemos que 6 dos 7 pacientes com genótipos SU/SU responderam à proteína recombinante. Essa resposta também esteve presente em 3 dos 7 pacientes portadores de genótipos SU/NE e 2 dos 4 pacientes portadores de genótipos SU/PRO. O paciente com genótipo PRO/PRO não respondeu à rDSG1 (Figura 45). Porém, no grupo de pacientes portadores de 2 alelos de susceptibilidade ao PF há uma quantidade maior de indivíduos não tratados (5 dos 7 pacientes analisados), fato que influencia diretamente a positividade da resposta humoral à proteína recombinante. Quando a mesma análise é aplicada à resposta celular, o número de pacientes SU/SU respondedores à rDSG1 mantém-se inalterado. Em pacientes portadores de genótipos SU/NE e SU/PRO essa quantidade aumenta (5 de 7 pacientes e 3 de 4 pacientes, respectivamente). O paciente com genótipo PRO/PRO não respondeu à rDSG1 (Figura 46).

FIGURA 45 – REATIVIDADE HUMORAL INDIVIDUAL PARA A rDSG1 EM PACIENTES PF AGRUPADOS DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE / RESISTÊNCIA AO PF



FONTE: o autor (2009)

FIGURA 46 – REATIVIDADE CELULAR INDIVIDUAL PARA A rDSG1 EM PACIENTES PF AGRUPADOS DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA A PF



FONTE: o autor (2009)

Também foi analisada a reatividade humoral e celular frente aos peptídeos de acordo com o agrupamento de genótipos *HLA-DRB1* seguindo a classificação anteriormente descrita.

Observou-se que indivíduos sadios que possuem ao menos um alelo de susceptibilidade em heterozigose, incluído nos genótipos SU/NE e SU/PRO, possuem reatividade contra peptídeos sintéticos do primeiro, segundo e quinto domínios extracelulares da proteína DSG1 (Figura 47). Já anticorpos de indivíduos sadios contendo apenas alelos de proteção e neutros em heterozigose (PRO/NE) reconhecem apenas peptídeos do quinto domínio extracelular da DSG1 (EC5 524-540 e EC5 530-549). Indivíduos homozigotos PRO/PRO e NE/NE reconhecem peptídeos EC5, com exceção de um indivíduo de cada grupo, que apresentaram também reatividade a peptídeos EC1 e EC2 (Figura 47).

A resposta celular aos peptídeos sintéticos de DSG1 é pouco freqüente em indivíduos sadios, apenas 1 de 5 indivíduos SU/NE e 2 de 3 indivíduos SU/PRO responderam a peptídeos do quinto domínio extracelular, não apresentando reatividade aos demais ectodomínios. Indivíduos portadores de genótipos NE/NE

apresentaram reatividade celular a peptídeos do segundo e quinto domínios extracelulares da DSG1. Percebe-se ausência de reatividade celular naqueles que compartilham os genótipos PRO/PRO e PRO/NE (Figura 48).

Ao comparar o padrão de resposta humoral a peptídeos sintéticos da DSG1 em pacientes, observou-se o reconhecimento de vários peptídeos (EC1, EC2 e EC5) naqueles que possuem 2 alelos de susceptibilidade (SU/SU) em relação a pacientes com o genótipo SU/NE e SU/PRO. É interessante notar que pacientes não-tratados possuem uma resposta de anticorpos dirigida a um maior número de epítomos da proteína desmogleína 1 (Figura 49).

A resposta celular a peptídeos sintéticos da DSG1 foi encontrada em 50% dos pacientes com genótipos de susceptibilidade, independentemente do tratamento. Pacientes com os genótipos SU/PRO e SU/SU, reconheceram 8 e 4 de 14 peptídeos, respectivamente. Pacientes com o genótipo SU/NE responderam a dois peptídeos de cada ectodomínio analisado, com exceção do paciente PF11, que respondeu a 8 diferentes peptídeos (Figura 50).

FIGURA 47 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM INDIVÍDUOS SADIOS AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF

Peptídeo	Indivíduos sadios																	
	SU/NE					SU/PRO		PRO/PRO			PRO/NE			NE/NE				
	2	6	8	12	21	1	11	4	5	16	9	10	23	20	3	7	13	17
EC1 (52-72)																		
EC1 (63-83)																		
EC1 (72-91)																		
EC1 (88-105)																		
EC1 (125-148)																		
EC1 (141-158)																		
EC2 (184-206)																		
EC2 (204-218)																		
EC2 (216-235)																		
EC2 9235-258)																		
EC2 (243-258)																		
EC5 (449-518)																		
EC5 (524-540)																		
EC5 (530-549)																		

Legenda:

D.O < 0,1

D.O 0,1 - 0,3

D.O 0,3 - 0,6

D. O 0,6 - 0,8

D. O 0,8 - 1,2

D. O > 1,2



NOTA: D.O de corte: 0,240

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 48 – RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM INDIVÍDUOS SADIOS, AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF

Peptídeo	Indivíduos Sadios															
	SU/NE					SU/PRO			PRO/PRO		PRO/NE			NE/NE		
	2	6	8	12	24	11	25	26	4	5	9	10	23	3	7	17
EC1 (52-72)																
EC1 (63-83)																
EC1 (72-91)																
EC1 (88-105)																
EC1 (125-148)																
EC1 (141-158)																
EC2 (184-206)																
EC2 (204-218)																
EC2 (216-235)																
EC2 (235-258)																
EC2 (243-258)																
EC5 (449-518)																
EC5 (524-540)																
EC5 (530-549)																

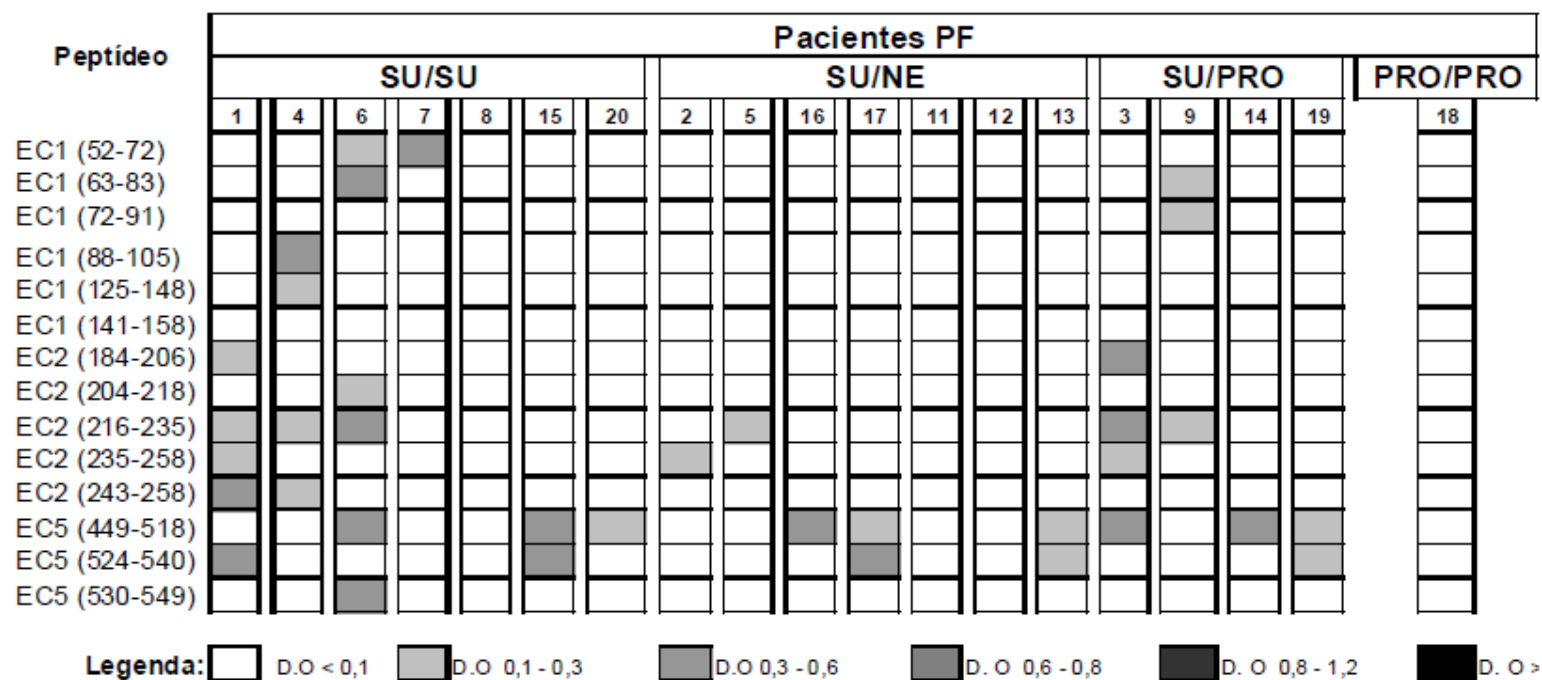
LEGENDA:

	I.E < 2,0
	I.E ≥ 2,0

NOTA: D.O de corte: 0,240

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 49 – RESUMO DA REATIVIDADE HUMORAL AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF, AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF



NOTA: D.O de corte: 0,240

FONTE: o autor (2009)

FIGURA 50 – RESUMO DA REATIVIDADE CELULAR AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DOS ECTODOMÍNIOS EC1, EC2 E EC5 DA DSG1 EM PACIENTES PF, AGRUPADOS DE ACORDO OS GENÓTIPOS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA AO PF

Peptídeo	Pacientes PF																		
	SU/SU						SU/NE							SU/PRO				PRO/PRO	
	1	4	6	7	8	15	20	2	5	16	17	11	12	13	3	9	14	19	18
EC1 (52-72)																			
EC1 (63-83)																			
EC1 (72-91)																			
EC1 (88-105)																			
EC1 (125-148)																			
EC1 (141-158)																			
EC2 (184-206)																			
EC2 (204-218)																			
EC2 (216-235)																			
EC2 (235-258)																			
EC2 (243-258)																			
EC5 (449-518)																			
EC5 (524-540)																			
EC5 (530-549)																			

LEGENDA:

I.E < 2,0

I.E ≥ 2,0

NOTA: D.O de corte: 0,240

FONTE: o autor (2009)

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisou-se o perfil das respostas humoral e celular de pacientes com pênfigo foliáceo à proteína DSG1 e peptídeos sintéticos desenhados a partir do primeiro, segundo e quinto domínio extracelulares desta. Procuramos por associações entre reatividade celular e humoral e a presença de alelos e genótipos do gene *HLA-DRB1* associados com a susceptibilidade à doença.

Identificamos um epítipo constituído por 24 resíduos de aminoácidos, localizado no segundo domínio extracelular da DSG1, resíduos de 235 a 258, reconhecido preferencialmente por linfócitos T e anticorpos de pacientes com PF portadores de pelo menos um alelo de susceptibilidade. Este achado é relevante, pois até o presente apenas regiões correspondentes a ectodomínios inteiros, apresentando reatividade humoral, foram descritas (LI e cols., 2003), sem uma correlação detalhada com os alelos *HLA-DRB1* de susceptibilidade ao PF.

Interessantemente, indivíduos sadios não apresentam anticorpos contra este peptídeo. A ausência de reatividade celular de CMSP também foi observada em indivíduos sadios, com exceção de um, portador de dois alelos *HLA-DRB1* neutros, fato que sugere papel relevante desta região na patogênese do PF.

A reatividade celular ao peptídeo EC2 (235-258) não foi encontrada em CMSP de todos os pacientes provavelmente pelo fato de que há número reduzido de LT CD4⁺ de memória autorreativos à DSG1. Mesmo assim, observamos o reconhecimento preferencial desse peptídeo pelo grupo de pacientes não-tratados ($P=0,0297$). A clonagem de linfócitos T de sangue periférico favorece o isolamento de clones de células T autorreativos ao autoantígeno de PF. Apesar do pequeno número de clones estabelecidos e testados no presente trabalho, observamos que o paciente PF17 apresentou ausência de reatividade de CMSP ao peptídeo EC2 (235-258), mas apresentou reconhecimento celular por um clone de linfócito T derivado dessas células. Outra observação bastante interessante é que, em dois pacientes PF (PF13 e PF15) em início de tratamento, com lesões ativas, encontramos linfócitos autorreativos ao peptídeo EC2 (235-258) em linhagens e clones de LT intralesionais, porém não detectamos resposta celular em CMSP, reforçando a premissa de que possam existir células de memória auto-reativas com baixa frequência, conforme mencionado.

A reatividade humoral ao peptídeo EC2 (235-258) foi encontrada somente em pacientes PF não-tratados ($P=0,0051$). Este fato pode estar relacionado ao uso de imunossupressores em pacientes em tratamento. No PF, o tratamento faz-se principalmente por corticosteróides (glicocorticóides sintéticos - prednisona, por exemplo) via oral, na dose diária de 1 a 2mg/kg na fase ativa da doença, sendo reduzido em 5mg a cada semana a partir da obtenção da melhora clínica (CAMPBELL e cols., 2001). Os glicocorticóides são lipofílicos e atravessam a membrana plasmática dos linfócitos, ligando-se a receptores no citosol. Esse complexo hormônio-receptor é transportado para o núcleo, local onde se liga a sequências reguladoras no DNA, e promove a regulação positiva do inibidor do NF- $\kappa\beta$ (IK β). Esse inibidor se liga ao NF- $\kappa\beta$ no citosol, impedindo sua translocação para o núcleo. Como essa molécula é o principal fator de transcrição na ativação de genes das respostas imunes inata e adaptativa, a transcrição de genes de ativação de células T e citocinas é regulada negativamente (KINDT e cols., 2008). Dessa forma, os linfócitos B não são estimulados pelos LT CD4⁺, não havendo formação de plasmócitos e secreção de autoanticorpos. Porém, observamos a presença de células T reativas ao peptídeo EC2 (235-258) em um paciente em tratamento sem lesões ativas (PF11). Essas células provavelmente são LT CD4⁺ de memória, que, sob condições de redução de imunossupressão, podem levar ao quadro de reativação do processo do PF.

Outro epítipo, constituído por 20 resíduos de aminoácidos, localizado no segundo domínio extracelular da proteína desmogleína 1, resíduos de aminoácidos 216 a 235, foi reconhecido diferencialmente por anticorpos de pacientes com PF ($P=0,0008$). Devido à ausência de resposta celular a esse peptídeo, esse epítipo provavelmente é reconhecido durante o fenômeno de espalhamento intramolecular de epítopos, que leva à geração de autoanticorpos patogênicos contra o primeiro (EC1) e segundo (EC2) ectodomínios da proteína DSG1 em PF.

A resposta celular aos peptídeos do quinto domínio extracelular foi observada tanto em indivíduos saudáveis como pacientes, porém foram encontradas diferenças de resposta humoral entre pacientes não-tratados, tratados e indivíduos saudáveis.

Os peptídeos EC5 (524-540) e EC5 (530-549) foram reconhecidos por anticorpos de indivíduos saudáveis ($P=0,0094$ e $0,0039$, respectivamente) quando comparado ao grupo de pacientes. Já anticorpos presentes no soro de pacientes em

tratamento reconheceram o peptídeo EC5 (499-518) ($P=0,001$), quando comparados a indivíduos saudáveis.

A reatividade humoral e celular encontrada contra o quinto domínio extracelular da proteína desmogleína 1 (EC5) indica claramente a presença de autoimunidade fisiológica contra esse autoantígeno em indivíduos saudáveis. Um fato intrigante dessa resposta não-patológica é que esses autoanticorpos não se ligam à DSG1 em cortes histológicos de epiderme através da técnica de imunofluorescência indireta, apesar de possuírem titulação elevada pelo ensaio de ELISA (LI e cols., 2003). Pode ser que EC5, um ectodomínio curto próximo à membrana do queratinócito, seja seqüestrado *in vivo*, sendo incapaz de se ligar a autoanticorpos anti-DSG1 circulantes. Vários fatores influenciam o reconhecimento de novos epítomos dentro da mesma molécula por LT e/ou LB com sítios antigênicos inicialmente não-reativos de modo cruzado. Um dos principais fatores são os alelos *HLA-DRB1* de susceptibilidade ao PF que são menos freqüentes em indivíduos saudáveis com autoanticorpos específicos para o quinto domínio extracelular de DSG1. É possível que as células apresentadoras de antígenos que expressem moléculas HLA de classe II codificadas pelos alelos de susceptibilidade ao PF sejam capazes de apresentar peptídeos da DSG1 aos LT $CD4^+$ que possuam receptores específicos para seqüências do EC1 e EC2 da DSG1. Na seqüência, essas células T estimulariam LB com receptores específicos para EC1 e EC2 como, por exemplo, para os peptídeos identificados no presente estudo, levando à produção e secreção de autoanticorpos patogênicos da subclasse IgG4, que levariam à perda de adesão celular e formação das lesões de pele.

Os dois peptídeos reconhecidos preferencialmente pelo grupo de indivíduos saudáveis compartilham a seqüência SEPGNGAKDLL. Portanto, essa seqüência comum aos dois peptídeos pode ser parte de um epítomo imunodominante da proteína DSG1, apresentado pelas moléculas HLA-DR ao linfócito T $CD4^+$ que leva à secreção de citocinas de perfil Th2, culminando com a produção de autoanticorpos anti-DSG1 não patogênicos da subclasse IgG1 pelos linfócitos B. Além disso, a reatividade celular e humoral à esses peptídeos foi encontrada em pacientes não-tratados e em tratamento, mostrando que a resposta imunológica à seqüência de aminoácidos SEPGNGAKDLL está presente tanto na fase pré-clínica quanto clínica do PF. A presença de autoanticorpos não-patogênicos das subclasses IgG1 e IgG4 em indivíduos na fase ativa da doença já foi observadas em outros estudos

(WARREN e cols., 2003). Dessa forma, é provável que essa sequência antigênica seja compartilhada com o agente ambiental, o que permitiria hipotetizar que a especificidade para o quinto domínio extracelular da desmogleína 1 seja devido ao mimetismo molecular. Essa especificidade é característica da fase pré-clínica de PF, antes que haja o espalhamento intramolecular de epítomos (LI e cols., 2003). Segundo os autores, a transição da fase pré-clínica para a fase clínica da doença está associada à emergência de autoanticorpos patogênicos da subclasse IgG4, específicos para o primeiro e segundo domínios extracelulares da DSG1. O fato de não ter sido observada homologia de sequência entre EC5 e os demais ectodomínios de DSG1 (EC1 a EC4), levou à proposta de um modelo no qual não ocorre reatividade cruzada de autoanticorpos para os diferentes ectodomínios da proteína. Postula-se que a geração de autoanticorpos patogênicos se dá pelo mecanismo de “espalhamento intramolecular de epítomos” e ocorre em indivíduos geneticamente predispostos (LI e cols., 2003). Neste trabalho, identificamos um peptídeo imunodominante do segundo domínio extracelular, preferencialmente reconhecidos por LT e anticorpos de pacientes não-tratados, relacionado à presença de pelo menos um alelo *HLA-DRB1* de susceptibilidade à doença, que provavelmente desencadeia papel preponderante no mecanismo que leva à geração de lesões. Seu reconhecimento provavelmente é posterior à reatividade dirigida a EC5.

Pacientes com PF em fase de remissão da doença possuem baixa resposta de autoanticorpos da subclasse IgG4 quando comparados aos níveis presentes durante a fase ativa da doença (74,3 vezes maior) (WARREN e cols., 2003). No presente estudo, foi observada a reatividade humoral preferencial aos peptídeos EC5 (499-518) em pacientes em tratamento. Esse epítopo, provavelmente reconhecido por autoanticorpos anti-DSG1 não-patogênicos da subclasse IgG1, pode ser indicativo do início da remissão da fase ativa da doença, a partir do tratamento com imunossupressores.

As caderinas epidérmicas desmogleína e desmocolina, que fazem parte dos desmossomos, representam uma família de moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, que são os alvos de atuação de autoanticorpos em pênfigo. No pênfigo vulgar, o autoantígeno é a desmogleína 3 (tipo predominante nas mucosas) e as desmogleínas 3 e 1 (tipo muco-cutâneo). No PF, o autoantígeno é a

DSG1. A desmogleína 1 está presente ao longo de toda a epiderme, mais intensamente nas camadas superiores, entretanto é expressa fracamente em mucosas (AMAGAI e cols., 1991; WANG e cols., 1994; AMAGAI, 1999). Interessantemente, em três pacientes PV por nós estudados paralelamente, observamos reconhecimento humoral aos peptídeos EC2 (216-235), EC2 (243-258) e EC5 (524-540) por parte de um paciente (dados não-mostrados). Esse paciente possuía somente lesões orais. Ao comparar a similaridade dos peptídeos da DSG1 contra os quais o soro desse paciente PV é reativo com segmentos homólogos da DSG3, verificamos que os peptídeos EC2 (216-235) e EC2 (243-258) tem 60% e 56% de identidade com peptídeos da desmogleína 3, respectivamente. Já o peptídeo EC5 (524-540) apresenta apenas dois aminoácidos coincidentes com a sequência do peptídeo correspondente da DSG3 (11,8% de identidade). Sugerimos que os autoanticorpos anti-DSG1 presentes nesse paciente, contra o quinto domínio extracelular, sejam não patogênicos. A ocorrência de espalhamento intramolecular de epítomos poderia levar à secreção de anticorpos anti-DSG1 patogênicos, mudando o quadro clínico do paciente de lesões orais para lesões muco-cutâneas. Outro paciente com PV em tratamento, com a forma muco-cutânea da doença, apresentou reatividade humoral aos peptídeos EC2 (184-206), EC5 (524-540) e EC5 (530-549) (dados não mostrados). Esses peptídeos sintéticos da proteína DSG1 possuem 73%, 11,8% e 30% de identidade com peptídeos da DSG3, respectivamente. É possível que o reconhecimento humoral do peptídeo EC2 (184-206) seja DSG1-específico. Ele é reconhecido por 3 dos 23 pacientes com PF analisados. Porém, considerando a grande similaridade com o peptídeo correspondente da DSG3, não se pode descartar a hipótese de que tenha ocorrido reação cruzada com autoanticorpos anti-DSG3. Cabe salientar ainda, que o soro desse paciente reconheceu fortemente a rDSG1.

LIN e cols. (2000) mostraram que a resposta proliferativa de clones de LT de sangue periférico à DSG1 foi bloqueada por anticorpos anti-HLA-DR, porém não por anticorpos anti-HLA-DQ e anti-HLA-DP, indicando papel crucial das moléculas HLA-DR na apresentação de peptídeos do autoantígeno DSG1.

Para analisarmos a relação entre os genótipos de *HLA-DRB1* e as respostas humoral e celular encontradas nos grupos de pacientes não-tratados, em tratamento e indivíduos sadios, re-classificamos os genótipos de acordo com os alelos

associados ao PF na população brasileira. Os alelos dos grupos *HLA-DRB1* *01 e *04, são alelos de susceptibilidade (SU) ao PF, enquanto os alelos dos grupos *HLA-DRB1* *07, *08 e *11 e o alelo *0301 estão associados à proteção (PRO). Os demais alelos *HLA-DRB1* foram classificados como neutros (NE) (PAVONI e cols., 2003).

No presente trabalho, observamos que pacientes não tratados que possuem dois alelos *HLA-DRB1* de susceptibilidade, compartilham o genótipo *HLA-DRB1**01/04. Naqueles pacientes cuja tipificação *HLA-DRB1* de alta resolução foi concluída, o alelo do grupo *HLA-DRB1* *01 presente nos pacientes PF, é *DRB1* *0102. Este alelo confere maior risco relativo para o PF (OR=10,36; $P<10^6$) (PAVONI e cols., 2003). Anticorpos de pacientes com genótipo *HLA-DRB1* SU/SU reconheceram um espectro composto por 9 diferentes peptídeos do 1º e 2º domínios extracelulares da proteína DSG1 em comparação a pacientes não-tratados com o genótipo *HLA-DRB1* SU/NE, os quais reconheceram apenas os peptídeos EC2 (216-235) e EC2 (235-258), identificados pelo presente estudo como imunodominantes para a fase ativa da doença. O grupo alélico *HLA-DRB1* de susceptibilidade compartilhado por esses pacientes é *DRB1* *01 ou *DRB1* *04 e um alelo neutro dos grupos *DRB1* *12, *13, *14, *15 e *16. Dois pacientes não-tratados portadores do genótipo *HLA-DRB1* SU/PRO reconheceram dois peptídeos do primeiro ectodomínio [EC1 (63-83) e EC1 (72-91)] e três peptídeos do segundo ectodomínio extracelular [EC2 (184-206), EC2 (216-235) e (EC2 (235-258)] da proteína DSG1. O único paciente com genótipo *HLA-DRB1* PRO/PRO não apresentou resposta celular à rDSG1 nem aos peptídeos sintéticos. Esse paciente estava em tratamento, sendo difícil analisar se a ausência de reatividade deve-se ao genótipo *HLA-DRB1* composto por dois alelos de proteção e/ou o baixo número de LT de memória.

Apesar de estudos anteriores terem demonstrado que o reconhecimento de epítomos pelo soro de pacientes com PF era conformacionalmente sensível (KOWALCZYK e cols., 1995) e dependente de cálcio (LABIB e cols., 1991), no presente estudo vimos que autoanticorpos de pacientes com PF e indivíduos saudáveis também são capazes de reconhecer peptídeos lineares sintéticos da proteína DSG1. O reconhecimento humoral de um maior número de peptídeos referentes ao EC1 e EC2 de DSG1 está relacionado à presença de dois alelos *HLA-DRB1* de susceptibilidade ao PF. A reatividade a alguns segmentos dos ectodomínios EC1, EC2 e à maioria dos segmentos do ectodomínio EC5 também foi observada em

indivíduos sadios, devido à resposta autoimune fisiológica a esses ectodomínios.

A autoimunidade fisiológica contribui para a manutenção da homeostase do organismo, agindo através de vários mecanismos. Autoanticorpos anti-colesterol são seletivos para as lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e intermediária (VLDL), sendo específicos para o grupo 3 β -hidróxi do colesterol. Esse epítipo não é exposto na superfície da lipoproteína de alta densidade do colesterol (HDL), fato que faz com que apenas o colesterol nocivo à saúde seja eliminado (ALVING e cols., 1999). O fator reumatóide consiste em autoanticorpos contra a região constante da IgG. Está presente em altos títulos no soro de pacientes com artrite reumatóide e outras doenças relacionadas ao colágeno, porém também é observado em indivíduos sadios em menor quantidade, aumentando transitoriamente sob estímulos imunogênicos tais como infecções e vacinas (MASLLORÉNS, 2000). Apesar de seu papel patogênico, o fator reumatóide coopera na eliminação de complexos antígeno-anticorpo que são formados em pequenas quantidades como reflexo do funcionamento normal do organismo. Outros autoanticorpos atuam na eliminação de eritrócitos em degeneração, com baixa capacidade de transporte de oxigênio ou participam da eliminação de componentes citoplasmáticos e nucleares provenientes do metabolismo celular, prevenindo assim o desencadeamento de respostas imunes contra antígenos próprios intensas (MASLLORÉNS, 2000).

Doenças autoimunes podem originar-se a partir da exacerbação da resposta autoimune fisiológica, através do aumento do título ou afinidade de autoanticorpos de ocorrência natural, troca de isotipo em imunoglobulinas, ou ainda quando há mudança na atividade ou sub-população de linfócitos T autorreativos (MASLLORÉNS, 2000). Os autoanticorpos anti-EC5 no PF podem atuar na neutralização da reação cruzada desencadeada a partir do reconhecimento antigênico de algum componente transmitido pelo agente etiológico, evitando assim que haja uma resposta imune contra a desmogleína 1. Em indivíduos geneticamente susceptíveis, ocorre mudança nesse perfil de reconhecimento dos autoanticorpos, gerando uma resposta patogênica contra ectodomínios da proteína componente do desmossomo epidérmico, levando à perda de adesão, e formação de bolhas e conseqüentemente lesões. A partir dessas considerações, postula-se que o cerne fundamental das doenças autoimunes consiste em uma mudança qualitativa, e algumas vezes quantitativa, na resposta imune ao próprio (MASLLORÉNS, 2000). A

autoimunidade é um evento que raramente causa doenças autoimunes enquanto permanece em níveis fisiológicos de ação dentro do organismo. Ela atua continuamente e de maneira silenciosa para preservar a homeostase do organismo. A quebra de tolerância ao próprio dá origem ao estado de autoimunidade patológica, que ocorre a partir da desregulação do reconhecimento autoimune que ocorre constantemente no organismo.

No presente trabalho, a reatividade de clones de LT de CMSP e intralesionais aos peptídeos sintéticos da DSG1 foi 16%. Apesar da resposta humoral ser mais acentuada no PF, fato que já era esperado uma vez que a resposta de LT CD4⁺ possui perfil Th2 de secreção de citocinas (LIN e cols., 2000), a reatividade dos clones gerados e analisados no presente estudo está de acordo com dados da literatura. Modelos de células auto-reativas para Febre Reumática (FR) apresentaram 19,6% de reatividade a peptídeos da proteína M5 em clones de LT CD4⁺ infiltrantes de tecido cardíaco (GUILHERME e cols., 2001). A FR apresenta perfil Th1 de secreção de citocinas, produzidas principalmente por LT infiltrantes do tecido valvar, que possivelmente contribuem na formação de lesões de válvula observadas na doença reumática cardíaca (GUILHERME e cols., 2004).

Células Treg CD4⁺CD25⁺ e Tr1 parecem ter um papel-chave na manutenção da tolerância a antígenos endógenos e na regulação da resposta imune induzida por antígenos exógenos. O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é doença crônica sistêmica autoimune, de etiologia desconhecida. Pacientes com LES ativo exibem um defeito quantitativo nas células Tregs CD4⁺CD25⁺. A diminuição no número dessas células está relacionado com a gravidade clínica das lesões cutâneas (CRISPIN e cols., 2004). O número de células Treg atinge níveis próximos aos normais durante a remissão da doença. Recidivas do LES são, portanto, associadas à diminuição global dessas células e não a fenômenos de redistribuição tecidual (MIYARA e cols., 2005). Células TR1 foram preferencialmente isoladas a partir do sangue periférico de indivíduos saudáveis portadores de genótipos HLA de susceptibilidade genética ao PV e em um pequeno número de pacientes durante a fase ativa da doença. As células Tr1 exibiram ação inibitória sobre a proliferação de clones Th autorreativos respondedores à DSG3, independente de contato celular e na presença das citocinas IL-10 e TGF- β . Esses achados sugerem envolvimento das células Tr1 na manutenção da auto-tolerância à DSG3 (VELDMAN e cols., 2004a).

Em outro estudo, o bloqueio da interação entre as moléculas CD40 e CD154 com anticorpo monoclonal anti-CD154 reduziu a produção de autoanticorpos anti-DSG3 do tipo IgG, prevenindo a formação de lesões em um modelo experimental de PV. A tolerância à DSG3 resultante foi transferida pelas células esplênicas de animais tratados com o anticorpo anti-CD154. Esses dados sugerem que o anticorpo monoclonal anti-CD154 induz tolerância à DSG3 pela indução de células imunorreguladoras (OKI-OTA e cols., 2006). Assim, células Tr1 respondedoras à DSG3 ou células imunorreguladoras induzidas por tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD154 podem representar a ferramenta ideal para restaurar terapeuticamente a tolerância imune à DSG3 específica.

A observação de que uma proporção maior dos pacientes em tratamento apresentou reatividade celular de CMSP aos peptídeos EC1 (72-91), EC1 (125-148) e EC2 (204-218), em comparação a pacientes não-tratados e indivíduos saudáveis, e a ausência de resposta humoral, associada a uma maior reatividade celular a esses peptídeos no grupo de pacientes em tratamento, sugere a presença de células T reguladoras específicas para essas sequências de aminoácidos do 1º e 2º ectodomínios da proteína desmogleína 1 no sangue periférico de pacientes em tratamento. Dessa forma, esses três peptídeos reconhecidos por LT CD4⁺ de pacientes em tratamento podem ativar células T reguladoras, suprimindo por sua vez, a ativação dos LT CD4⁺ Th2. As células suprimidas perdem a capacidade de estimular os LB a produzirem autoanticorpos anti-DSG1 patogênicos da subclasse IgG4 contra os primeiro e segundo ectodomínios da DSG1, alvos reconhecidos por anticorpos durante a fase ativa da doença, iniciando a regressão do quadro de autoimunidade patológica.

A resposta celular aos peptídeos sintéticos da proteína DSG1 em pacientes com PF não-tratados e em tratamento é bastante heterogênea entre os indivíduos do mesmo grupo, não possibilitando relacionar o espectro de peptídeos reconhecidos com os genótipos HLA-DRB1 de susceptibilidade e resistência à doença.

A resposta humoral à rDSG1 foi observada na maioria dos pacientes com PF não-tratados e esteve presente em um menor número de pacientes em tratamento. Quando pacientes não-tratados e em tratamento foram agrupados e redistribuídos de acordo com a forma de manifestação das lesões de pele, observamos reatividade

humoral em um maior número de pacientes com lesões localizadas (cabeça e pescoço) quando comparados a pacientes com lesões disseminadas pelo corpo (forma generalizada da doença). Após comparação com a reatividade humoral do soro de indivíduos sadios à rDSG1, observamos que a proteína recombinante foi preferencialmente reconhecida por pacientes não tratados e com a forma localizada de PF, comparado a indivíduos sadios. Encontramos ainda, diferenças estatisticamente significantes com relação a reatividade humoral à rDSG1 entre os grupos de pacientes não-tratados e em tratamento ($P=0,0097$), mostrando que a proteína recombinante foi preferencialmente reconhecida no grupo de pacientes não-tratados.

Em um estudo de pacientes com PF da reserva Limão Verde (MS) e de Goiânia (GO), verificou-se 97% ($n=31$) e 100% ($n=29$) de reatividade humoral à DSG1, respectivamente. Porém, a proporção de pacientes não-tratados e em tratamento não foi mencionada nesse estudo (WARREN e cols., 2000a).

No presente trabalho, 17% dos indivíduos sadios analisados, apresentaram reatividade humoral à rDSG1. Os soros analisados foram provenientes, em sua maioria, de indivíduos sadios residentes na cidade de São Paulo (SP). WARREN e cols. (2000a) mostraram em seu estudo que a proporção de indivíduos sadios residentes no Brasil que possuem resposta humoral ao autoantígeno de PF, e o valor positivo médio da DO nos ensaios de ELISA aumentam progressivamente em função da proximidade da residência da área endêmica da reserva Limão Verde (MS) os indivíduos sadios residirem. Os testes para autoanticorpos anti-DSG1 em indivíduos sadios foram positivos em: (i) 21% ($n=24$) dos residentes em São Paulo (SP); (ii) 10% ($n=58$) dos residentes em Campo Grande (MS); (iii) 11% ($n=108$) dos residentes em Aquidauana (MS) e (iv) 28% ($n=65$) dos residentes na sub-região da reserva de Córrego Seco (MS). Na sub-região da reserva Limão Verde (MS), 39% ($n=38$) dos indivíduos sadios não relacionados com os pacientes PF tiveram resposta humoral à DSG1. Essa proporção foi de 65% ($n=55$) em parentes de pacientes PF. Quando esse mesmo teste foi realizado em indivíduos sadios dos EUA e Japão, apenas 2% ($n=126$) apresentaram reatividade humoral ao autoantígeno de PF.

Devido aos achados acima descritos, sugere-se que em regiões com alta prevalência de PF, há um número maior de indivíduos sadios que possuem

anticorpos contra a DSG1, indicando a possível presença de um fator desencadeador na região na qual a doença é endêmica. Dessa forma, a patogênese do PF pode ser resumida em duas etapas principais: (i) um período inicial de sensibilização, possivelmente mediado por mimetismo molecular entre o fator ambiental e a DSG1; (ii) progressão subsequente para a fase clínica da doença, com aumento dos níveis séricos de anticorpos anti-DSG1 em um subgrupo dos indivíduos previamente sensibilizados (WARREN e cols., 2000a).

A resposta celular à rDSG1 em CMSP foi observada em um maior número de pacientes não-tratados, quando comparados a pacientes PF em tratamento. Quando a reatividade celular em CMSP foi comparada entre as duas formas clínicas da doença ativa, observou-se que todos os pacientes com a forma localizada do PF responderam à rDSG1, enquanto essa porcentagem em pacientes com a forma generalizada do PF, foi 50%. Isso deve-se ao fato de um maior número de pacientes com a forma generalizada encontrar-se sob tratamento no momento da coleta do material biológico. Não encontramos reatividade celular de CMSP em indivíduos sadios. Dessa forma, a rDSG1 foi preferencialmente reconhecida por pacientes com PF em todas as análises, quando comparados aos indivíduos sadios. Observamos ainda o reconhecimento preferencial da proteína recombinante em CMSP de pacientes com a forma localizada do PF quando comparados àqueles com a forma generalizada da doença ($P=0,0419$), que se deve provavelmente ao mesmo motivo descrito anteriormente, para a associação encontrada na resposta humoral.

HANS-FILHO e cols. (1999) analisaram a resposta proliferativa de LT de sangue periférico frente a DSG1 em 10 pacientes com PF provenientes da reserva Limão Verde (MS). Nove deles apresentaram resposta proliferativa, com índices de estimulação (I.E.) entre 3,1 e 17,8. Nenhum dos indivíduos controles (7 indivíduos sadios e um paciente com LES) responderam à DSG1 recombinante.

LIN e cols. (2000) caracterizaram o perfil da resposta de células T de sangue periférico em PF e mostraram que os pacientes com PF, em sua maioria, possuem linfócitos T circulantes que proliferam em resposta ao domínio extracelular da DSG1. Essa resposta foi restrita à apresentação via moléculas HLA-DR. As células T responsivas ao autoantígeno de PF possuem fenótipo LT CD4⁺ de memória e produzem um perfil Th2 de citocinas. Treze dos 15 pacientes PF analisados, oriundos da reserva Limão Verde, apresentaram resposta proliferativa à DSG1 com

índices de estimulação variando entre 2,1 e 17,8. O I.E. de corte para positividade da resposta foi 3,0.

No presente trabalho, os I.E. observados em CMSP de pacientes PF em resposta à rDSG1 variaram de 2,0 a 2,7 e o I.E. de corte para positividade da resposta foi 2,0. Esse índice de estimulação, abaixo dos encontrados em estudos anteriores, pode ser ocasionado por um menor número de LT CD4⁺ de memória presentes nos pacientes aqui analisados. Outro fator interligado ao índice de resposta celular de LT à DSG1 é o título de anticorpos anti-DSG1. No presente trabalho, não foi realizada a titulação de anticorpos nos pacientes PF, mas no estudo de LIN e cols. (2000) mostrou-se que pacientes com os maiores I.E., possuíam em sua maioria, os títulos mais elevados de anticorpos anti-DSG1. Em outro estudo, foi mostrado que o título médio de autoanticorpos anti-DSG1 aumenta com a proximidade da área endêmica da reserva Limão Verde (MS) (WARREN e cols., 2000a). Outra diferença entre os dois estudos diz respeito ao protocolo de proliferação utilizado no presente trabalho. Ambos os estudos utilizaram a mesma concentração da rDSG1 (20µg/ml), porém LIN e cols. (2000) utilizaram protocolo diferente de proliferação celular, no qual LT isolados de CMSP foram cultivados com APCs autólogas irradiadas por um período de tempo mais longo.

Ao comparar a reatividade celular e humoral à rDSG1 nos subgrupos de pacientes PF, foi observado que 90% dos pacientes não-tratados apresentaram reatividade humoral, e 88,9% apresentaram resposta celular à proteína recombinante. Essa diferença na proporção de indivíduos que responderam em ambos os ensaios deve-se ao fato de que um paciente foi testado apenas para a reatividade humoral e não foi testado para a reatividade celular. No presente estudo, todos os pacientes não tratados que apresentaram resposta humoral ao autoantígeno de PF, também apresentaram resposta celular a este.

Em pacientes em tratamento, a proporção de resposta humoral e celular foi 31% e 61,5%, respectivamente. Todos os pacientes que apresentaram resposta humoral à rDSG1 também apresentaram resposta celular, porém o contrário não foi observado. O número reduzido de pacientes em tratamento com resposta humoral à DSG1 deve-se, em parte, à ação dos imunossupressores, que diminuem a quantidade de anticorpos circulantes. Entretanto, os LT CD4⁺ de memória, ainda que em baixo número, estão presentes no sangue periférico dos pacientes com PF, o

que é confirmado pelo maior número de pacientes que apresentam resposta celular pós-supressão, em relação à resposta humoral. O tratamento reduz ou faz cessar a produção de autoanticorpos patogênicos, contribuindo para a melhora do estado clínico do paciente. Isso explica a recaída à fase ativa do PF após a interrupção do tratamento, em muitos pacientes.

Por fim, vários estudos demonstraram que linhagens celulares e clones de LT CD4⁺ derivados do sangue periférico de pacientes com PF possuem resposta proliferativa aos ectodomínios da proteína recombinante da DSG1. Essa resposta é restrita à apresentação de peptídeos por moléculas HLA-DR e promove a secreção de citocinas do tipo Th2, que estimulam a produção de autoanticorpos por LB autorreativos. Até o presente momento, nenhum peptídeo da DSG1 reconhecido por essas células T havia sido identificado.

O nosso trabalho identificou epítomos imunodominantes da proteína DSG1, tanto na fase pré-clínica, quanto clínica, da doença. O reconhecimento celular e humoral preferencial por pacientes ou indivíduos sadios está associado aos genótipos *HLA-DRB1* de susceptibilidade ao PF. Os peptídeos EC5 (524-540) e EC5 (530-549), mais freqüentemente reconhecidos por indivíduos sadios e também presentes em pacientes não tratados e em tratamento, compartilham uma sequência de aminoácidos que pode ser parte de um epítomo imunodominante reconhecido por autoanticorpos EC5 durante a reação cruzada originada por mimetismo molecular com algum componente transmitido durante a picada do provável agente etiológico *Simulium nigrimanum*.

A partir do mapeamento do epítomo imunodominante EC2 (235-258), reconhecido preferencialmente por anticorpos e células T por pacientes não-tratados no presente estudo, postula-se que essa sequência seja alvo de reconhecimento por LT CD4⁺ durante o espalhamento intramolecular de epítomos no PF, processo que leva à geração de autoanticorpos patogênicos do tipo IgG4 contra sequências do primeiro e segundo ectodomínios da proteína DSG1.

Pacientes em tratamento, durante a fase de remissão da doença, mantêm células CD4⁺ de memória para esse peptídeo, porém apresentam resposta humoral preferencial por um terceiro epítomo de EC5, resíduos 499 a 518. Essa observação revela que os anticorpos não patogênicos gerados durante a fase de remissão clínica do PF são gerados contra um novo epítomo do quinto domínio extracelular,

não reconhecido preferencialmente por indivíduos sadios.

Estudos mais aprofundados envolvendo tanto a resposta humoral quanto a celular, dessas sequências, poderão contribuir para a descoberta de novas imunoterapias visando à indução de tolerância em indivíduos geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento do PF, principalmente naqueles residentes em áreas endêmicas.

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho, mapeamos um epítopo imunodominante envolvido na patogênese do PF, EC2 (235-258), reconhecido por CMSP, linhagens e clones de LT de CMSP, linhagens e clones de LT intralesionais e anticorpos de pacientes com pênfigo foliáceo.

✓ Resposta humoral:

Os peptídeos EC5 (524-540) e EC5 (530-549) do quinto domínio extracelular da desmogleína 1 foram os mais freqüentemente reconhecidos por indivíduos sadios.

Os peptídeos EC2 (216-235) e EC2 (235-258) do segundo domínio extracelular da desmogleína 1 são mais freqüentemente reconhecidos por pacientes PF não-tratados.

O peptídeos EC5 (499-518) do quinto domínio extracelular da desmogleína 1 é mais freqüentemente reconhecido por pacientes em tratamento.

Ocorre reconhecimento de um número maior de peptídeos dos domínios EC1, EC2 e EC5 da proteína desmogleína 1 em pacientes que possuem genótipo *HLA-DRB1* formado por dois alelos de susceptibilidade ao PF, quando comparado a pacientes com outros genótipos do mesmo gene.

✓ Resposta celular:

O peptídeo EC2 (235-258) do segundo domínio extracelular da desmogleína 1 é mais freqüentemente reconhecido por pacientes PF não-tratados.

REFERÊNCIAS

- AALBERSE, R. C., VAN DER, G. R., e VAN, L. J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. **J Immunol**, Baltimore, v.130,n.2,p. 722-726, 1983.
- AHMED, A. R., WAGNER, R., KHATRI, K., NOTANI, G., AWDEH, Z., ALPER, C. A., e YUNIS, E. J. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 88, n. 11, p. 5056-5060, 1991.
- ALVING, C. R. e WASSEF, N. M. Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism. **Immunol Today**, Londres, v. 20, n. 8, p. 362-366, 1999.
- AMAGAI, M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. **J Dermatol Sci**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 92-102, 1999.
- AMAGAI, M., KLAUS-KOVTUN, V., e STANLEY, J. R. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. **Cell**, Cambridge, v. 67, n. 5, p. 869-877, 1991.
- AMAGAI, M., TSUNODA, K., SUZUKI, H., NISHIFUJI, K., KOYASU, S., e NISHIKAWA, T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 105, n. 5, p. 625-631, 2000.
- ATHERTON, E. e SHEPPARD, R. C. Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach. Oxford University Press, 1989.
- AYED, M. B., MARTEL, P., ZITOUNI, M., GILBERT, D., TURKI, H., MOKNI, M., OSMAN, A. B., KAMOUN, M. R., ZAHAF, A., MAKNI, S., MASMOUDI, H., e TRON, F. Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with desmoglein 1 gene polymorphism. **Genes Immun**, Basingstoke, v. 3, n. 6, p. 378-379, 2002.
- BALLOTTI, S., CHIARELLI, F., e DE, M. M. Autoimmunity: basic mechanisms and implications in endocrine diseases. Part II. **Horm Res**, New York, v. 66, n. 3, p. 142-152, 2006b.
- BALLOTTI, S., CHIARELLI, F., e DE, M. M. Autoimmunity: basic mechanisms and implications in endocrine diseases. Part I. **Horm Res**, New York, v. 66, n. 3, p. 132-141, 2006a.
- BASTUJI-GARIN, S., SOUISSI, R., BLUM, L., TURKI, H., NOUIRA, R., JOMAA, B., ZAHAF, A., BEN, O. A., MOKHTAR, I., FAZAA, B., e . Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 104, n. 2, p. 302-305, 1995.

BHOL, K., NATARAJAN, K., NAGARWALLA, N., MOHIMEN, A., AOKI, V., e AHMED, A. R. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 92, n. 11, p. 5239-5243, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENNER, S. Pemphigus and diet. Have we solved the mystery of fogo selvagem? **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 455, p. 267-269, 1999.

BRENNER, S. e WOLF, R. Possible nutritional factors in induced pemphigus. **Dermatology**, Basel, v. 189, n. 4, p. 337-339, 1994.

BUXTON, R. S., COWIN, P., FRANKE, W. W., GARROD, D. R., GREEN, K. J., KING, I. A., KOCH, P. J., MAGEE, A. I., REES, D. A., STANLEY, J. R., e . Nomenclature of the desmosomal cadherins. **J Cell Biol**, New York, v. 121, n. 3, p. 481-483, 1993.

CALVANICO, N. J., SWARTZ, S. J., e DIAZ, L. A. Affinity immunoblotting studies on the restriction of autoantibodies from endemic pemphigus foliaceus patients. **J Autoimmun**, Londres, v. 6, n. 2, p. 145-157, 1993.

CAMPBELL, R., AOKI, V., CUNHA, P., HANS-FILHO, G., ALVES, G., ROCHA, R., e FRIEDMAN, H. Endemic pemphigus foliaceus/fogo selvagem. **Anais Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 76, p. 13-33, 2001.

CERMAKOVA, Z., RYSKOVA, O., HONEGR, K., CERMAKOVA, E., e HANOVCOVA, I. Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. **Med Sci Monit**, New York, v. 11, n. 4, p. BR121-BR125, 2005.

CERNA, M., FERNANDEZ-VINA, M., FRIEDMAN, H., MORAES, J. R., MORAES, M. E., DIAZ, L., e STASTNY, P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) in Xavante Indians. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 42, n. 3, p. 138-140, 1993.

CHAGAS, A. C., IVO, M. L., HONER, M. R., e CORREA, F. R. [Situation of endemic pemphigus foliaceus in Mato Grosso do Sul, Brazil, 1990-1999.]. **Rev Lat Am Enfermagem**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 274-276, 2005.

CHIOSSI, M. P. e ROSELINO, A. M. Endemic Pemphigus foliaceus ("Fogo selvagem"): a series from the Northeastern region of the State of Sao Paulo, Brazil, 1973-1998. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 59-62, 2001.

CHU, C. M. Immunoglobulin class M anti-hepatitis B core antigen for serodiagnosis of acute hepatitis: pitfalls and recommendations. **J Gastroenterol Hepatol**, Boston, v. 21, n. 5, p. 789-791, 2006.

COHEN, I. R. Tending Adam`s Garden - Evolving the cognitive Immune Self. Academic Press, v. 1, p. 1-259, 2000.

COMPTON, S. J. e JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal Biochem**, New York, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

COUTINHO, A., KAZATCHKINE, M. D., e AVRAMEAS, S. Natural autoantibodies. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 7, n. 6, p. 812-818, 1995.

CRISPIN, J. C., VARGAS, M. I., e COCER-VARELA, J. Immunoregulatory T cells in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 45-51, 2004.

DE OLIVEIRA, J. P., GABBI, T. V., HASHIMOTO, T., AOKI, V., SANTI, C. G., MARUTA, C. W., RIVITTI, E. A., e REIS, V. M. Two Brazilian cases of IgA pemphigus. **J Dermatol**, Tokyo, v. 30, n. 12, p. 886-891, 2003.

DIAZ, L. A., PRISAYANH, P. S., DASHER, D. A., LI, N., EVANGELISTA, F., AOKI, V., HANS-FILHO, G., DOS, S., V, QAQISH, B. F., e RIVITTI, E. A. The IgM anti-desmoglein 1 response distinguishes Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) from other forms of pemphigus. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 128, n. 3, p. 667-675, 2008.

DIAZ, L. A., SAMPAIO, S. A., RIVITTI, E. A., MARTINS, C. R., CUNHA, P. R., LOMBARDI, C., ALMEIDA, F. A., CASTRO, R. M., MACCA, M. L., LAVRADO, C., e . Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 92, n. 1, p. 4-12, 1989a.

DIAZ, L. A., SAMPAIO, S. A., RIVITTI, E. A., MARTINS, C. R., CUNHA, P. R., LOMBARDI, C., ALMEIDA, F. A., CASTRO, R. M., MACCA, M. L., LAVRADO, C., e . Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. **J Am Acad Dermatol**, Mosby, v. 20, n. 4, p. 657-669, 1989b.

EATON, D. P., DIAZ, L. A., HANS-FILHO, G., SANTOS, V. D., AOKI, V., FRIEDMAN, H., RIVITTI, E. A., SAMPAIO, S. A., GOTTLIEB, M. S., GIUDICE, G. J., LOPEZ, A., e CUPP, E. W. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **J Med Entomol**, Honolulu, v. 35, n. 2, p. 120-131, 1998.

FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M., e DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 84, n. 21, p. 7413-7417, 1987.

FERREIRA, R., BARRETO, M., SANTOS, E., PEREIRA, C., MARTINS, B., ANDREIA, R., CRESPO, F., VIANA, J. F., VASCONCELOS, C., FERREIRA, C., VICENTE, A. M., e FESEL, C. Heritable factors shape natural human IgM reactivity to Ro60/SS-A and may predispose for SLE-associated IgG anti-Ro and anti-La autoantibody production. **J Autoimmun**, Londres, v.25,n. 2, p. 155-163, 2005.

FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A., e RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, New York, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

FORGER, F., MATTHIAS, T., OPPERMANN, M., BECKER, H., e HELMKE, K. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. **Lupus**, Londres, v. 13, n. 1, p. 36-44, 2004.

GREEN, K. J., GOLDMAN, R. D., e CHISHOLM, R. L. Isolation of cDNAs encoding desmosomal plaque proteins: evidence that bovine desmoplakins I and II are derived from two mRNAs and a single gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 85, n. 8, p. 2613-2617, 1988.

GUILHERME, L., CURY, P., DEMARCHI, L. M., COELHO, V., ABEL, L., LOPEZ, A. P., OSHIRO, S. E., ALIOTTI, S., CUNHA-NETO, E., POMERANTZEFF, P. M., TANAKA, A. C., e KALIL, J. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 165, n. 5, p. 1583-1591, 2004.

GUILHERME, L., OSHIRO, S. E., FAE, K. C., CUNHA-NETO, E., RENESTO, G., GOLDBERG, A. C., TANAKA, A. C., POMERANTZEFF, P. M., KISS, M. H., SILVA, C., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., SOUTHWOOD, S., SETTE, A., e KALIL, J. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. **Infect Immun**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5345-5351, 2001.

HACKER-FOEGEN, M. K., FAIRLEY, J. A., e LIN, M. S. T cell receptor gene usage in desmoglein-3-specific T lymphocytes from patients with pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 121, n. 6, p. 1365-1372, 2003.

HAMANO, H., KAWA, S., HORIUCHI, A., UNNO, H., FURUYA, N., AKAMATSU, T., FUKUSHIMA, M., NIKAIDO, T., NAKAYAMA, K., USUDA, N., e KIYOSAWA, K. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. **N Engl J Med**, Boston, v. 344, n.10, p. 732-738, 2001.

HAMKAR, R., JALILVAND, S., MOKHTARI-AZAD, T., NOURI, J. K., HI-FAR, H., SOLEIMANJAH, H., e NATEGH, R. Assessment of IgM enzyme immunoassay and IgG avidity assay for distinguishing between primary and secondary immune response to rubella vaccine. **J Virol Methods**, Amsterdam, v. 130, n. 1-2, p. 59-65, 2005.

HANS-FILHO, G., AOKI, V., RIVITTI, E., EATON, D. P., LIN, M. S., e DIAZ, L. A. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)--1998. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **Clin Dermatol**, Philadelphia, v. 17, n. 2, p. 225-235, 1999.

HANS-FILHO, G., DOS, S., V, KATAYAMA, J. H., AOKI, V., RIVITTI, E. A., SAMPAIO, S. A., FRIEDMAN, H., MORAES, J. R., MORAES, M. E., EATON, D. P., LOPEZ, A. L., HOFFMAN, R. G., FAIRLEY, J. A., GIUDICE, G. J., e DIAZ, L. A. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 107, n. 1, p. 68-75, 1996.

HEIMGARTNER, E. e DE, H., V [Experience with endemic dermatological diseases in the Peruvian wilderness: mucocutaneous leishmaniasis and Brazilian foliaceous pemphigus]. **Med Cutan Ibero Lat Am**, Lisboa, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1976.

HERTL, M., AMAGAI, M., SUNDARAM, H., STANLEY, J., ISHII, K., e KATZ, S. I. Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 110, n. 1, p. 62-66, 1998a.

HERTL, M., KARR, R. W., AMAGAI, M., e KATZ, S. I. Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 110, n. 4, p. 388-392, 1998b.

HERTL, M. e RIECHERS, R. Analysis of the T cells that are potentially involved in autoantibody production in pemphigus vulgaris. **J Dermatol**, Tokyo, v. 26, n. 11, p. 748-752, 1999.

JONES, J. C., ARNN, J., STAEHELIN, L. A., e GOLDMAN, R. D. Human autoantibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 81, n. 9, p. 2781-2785, 1984.

KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., e OSBORNE, B. A. *Imunologia de Kuby*, v. 6, p. 1-667, 2008.

KOWALCZYK, A. P., ANDERSON, J. E., BORGWARDT, J. E., HASHIMOTO, T., STANLEY, J. R., e GREEN, K. J. Pemphigus sera recognize conformationally sensitive epitopes in the amino-terminal region of desmoglein-1. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 105, n. 2, p. 147-152, 1995.

KRICHELI, D., DAVID, M., FRUSIC-ZLOTKIN, M., GOLDSMITH, D., RABINOV, M., SULKES, J., e MILNER, Y. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. **Br J Dermatol**, Oxford, v. 143, n. 2, p. 337-342, 2000.

KURNIAWAN, A., YAZDANBAKHSH, M., VAN, R. R., AALBERSE, R., SELKIRK, M. E., PARTONO, F., e MAIZELS, R. M. Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. **J Immunol**, Baltimore, v. 150, n. 9, p. 3941-3950, 1993.

LABIB, R. S., ROCK, B., ROBLEDO, M. A., e ANHALT, G. J. The calcium-sensitive epitope of pemphigus foliaceus antigen is present on a murine tryptic fragment and constitutes a major antigenic region for human autoantibodies. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 96, n. 1, p. 144-147, 1991.

LARCHE, M., AKDIS, C. A., e VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, Londres, v. 6, n. 10, p. 761-771, 2006.

LI, N., AOKI, V., HANS-FILHO, G., RIVITTI, E. A., e DIAZ, L. A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogoselvagem). **J Exp Med**, New York, v. 197, n. 11, p. 1501-1510, 2003.

LI, N., ZHAO, M., HILARIO-VARGAS, J., PRISAYANH, P., WARREN, S., DIAZ, L. A., ROOPENIAN, D. C., e LIU, Z. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 115, n. 12, p. 3440-3450, 2005a.

LI, Q. Z., XIE, C., WU, T., MACKAY, M., ARANOW, C., PUTTERMAN, C., e MOHAN, C. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 115, n. 12, p. 3428-3439, 2005b.

LIN, M. S., FU, C. L., AOKI, V., HANS-FILHO, G., RIVITTI, E. A., MORAES, J. R., MORAES, M. E., LAZARO, A. M., GIUDICE, G. J., STASTNY, P., e DIAZ, L. A. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 105, n. 2, p. 207-213, 2000.

LIN, M. S., SWARTZ, S. J., LOPEZ, A., DING, X., FAIRLEY, J. A., e DIAZ, L. A. T lymphocytes from a subset of patients with pemphigus vulgaris respond to both desmoglein-3 and desmoglein-1. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 109, n. 6, p. 734-737, 1997a.

LIN, M. S., SWARTZ, S. J., LOPEZ, A., DING, X., FERNANDEZ-VINA, M. A., STASTNY, P., FAIRLEY, J. A., e DIAZ, L. A. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 99, n. 1, p. 31-40, 1997b.

LOISEAU, P., LECLEACH, L., PROST, C., LEPAGE, V., BUSSON, M., BASTUJIGARIN, S., ROUJEAU, J. C., e CHARRON, D. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **J Autoimmun**, Londres, v. 15, n. 1, p. 67-73, 2000.

LOMBARDI, C., BORGES, P. C., CHAUL, A., SAMPAIO, S. A., RIVITTI, E. A., FRIEDMAN, H., MARTINS, C. R., SANCHES JUNIOR, J. A., CUNHA, P. R., HOFFMANN, R. G., e . Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 98, n. 6, p. 847-850, 1992.

MALOY, K. J. e POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat Immunol**, New York, v. 2, n. 9, p. 816-822, 2001.

MANSON, J. J., MAURI, C., e EHRENSTEIN, M. R. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. **Springer Semin Immunopathol**, Berlin, v. 26, n. 4, p. 425-432, 2005.

MARSH, S. G., ALBERT, E. D., BODMER, W. F., BONTROP, R. E., DUPONT, B., ERLICH, H. A., GERAGHTY, D. E., HANSEN, J. A., MACH, B., MAYR, W. R., PARHAM, P., PETERSDORF, E. W., SASAZUKI, T., SCHREUDER, G. M., STROMINGER, J. L., SVEJGAARD, A., e TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, n. 5, p. 407-464, 2002.

MARTEL, P., GILBERT, D., DROUOT, L., PROST, C., RAUX, G., DELAPORTE, E., JOLY, P., e TRON, F. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes Immun**, Basingstoke, v. 2, n. 1, p. 41-43, 2001.

MASLLORÉNS, F. O. Autoimmune diseases and physiological autoimmunity: recognition of self. **Alergol Immunol Clin**, New York, v. 15, p. 5-12, 2000.

MIYARA, M., AMOURA, Z., PARIZOT, C., BADOUAL, C., DORGHAM, K., TRAD, S., NOCHY, D., DEBRE, P., PIETTE, J. C., e GOROCHOV, G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, Baltimore, v. 175, n. 12, p. 8392-8400, 2005.

MOESTA, A. K., LIN, M. S., DIAZ, L. A., e SINHA, A. A. T cell receptor Beta chain gene usage in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 119, n.2, p. 377-383, 2002.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**, Chicago, v. 185 Suppl 1, p. S73-S82, 2002.

MORAES, J. R., MORAES, M. E., FERNANDEZ-VINA, M., DIAZ, L. A., FRIEDMAN, H., CAMPBELL, I. T., ALVAREZ, R. R., SAMPAIO, S. A., RIVITTI, E. A., e STASTNY, P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, New York, v. 33, n. 5-6, p. 388-391, 1991.

MORAES, M. E., FERNANDEZ-VINA, M., LAZARO, A., DIAZ, L. A., FILHO, G. H., FRIEDMAN, H., RIVITTI, E., AOKI, V., STASTNY, P., e MORAES, J. R. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**, Chigaco, v. 49, n. 1, p. 35-40, 1997.

MORINI, J. P., JOMAA, B., GORGI, Y., SAGUEM, M. H., NOUIRA, R., ROUJEAU, J. C., e REVUZ, J. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. **Arch Dermatol**, Chicago, v. 129, n. 1, p. 69-73, 1993.

MOUTHON, L., LACROIX-DESMAZES, S., NOBREGA, A., BARREAU, C., COUTINHO, A., e KAZATCHKINE, M. D. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. **Scand J Immunol**, Oslo, v. 44, n. 3, p. 243-251, 1996.

NOLAN LAB. Disponível em: <<http://www.stanford.edu/group/nolan/>>. Acesso em: 7 mar. 2009.

NOSSAL, G. J. Immunology. How to stop bad B cells. **Nature**, Londres, v. 371, n. 6496, p. 375-376, 1994.

OBEL, N., HOIER-MADSEN, M., e KANGRO, H. Serological and clinical findings in patients with serological evidence of reactivated Epstein-Barr virus infection. **APMIS**, Copenhagen, v.104,n.6, p. 424-428, 1996.

OKI-OTA, M., KINOSHITA, M., OTA, T., TSUNODA, K., IWASAKI, T., TANAKA, S., KOYASU, S., NISHIKAWA, T., e AMAGAI, M. Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 126, n. 1, p. 105-113, 2006.

OLSSON, T. e MARTIN, R. Autoimmunity: Basic and clinical science approach complex diseases — new molecules and mechanisms. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 18, n. 6, p. 639-642, 2006.

PAVONI, D. P., ROXO, V. M., MARQUART, F. A., e PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes Immun**, Basingstoke, v. 4, n. 2, p. 110-116, 2003.

PETZL-ERLER, M. L. e MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **J Autoimmun**, Londres, v. 25, n. 2, p. 121-125, 2005.

PETZL-ERLER, M. L. e SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 33, n. 3, p. 408-414, 1989.

QIAGEN **The QIAexpressionist™**. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. **Qiagen** n. 5ª, 2003.

QYAN, Y., CLARKE, S. H., AOKI, V., HANS-FILHO, G., RIVITTI, E. A., e DIAZ, L. A. Antigen selection of the anti-DSG1 response in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) begins before the onset of clinical disease. **submitted** 2008.

REIS, M. M., TESSARO, M. M., e D'AZEVEDO, P. A. Toxoplasma-IgM and IgG-avidity in single samples from areas with a high infection rate can determine the risk of mother-to-child transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 93-98, 2006.

REISNER, A. H., NEMES, P., e BUCHOLTZ, C. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, New York, v. 64, n. 2, p. 509-516, 1975.

RICKMAN, L., SIMRAK, D., STEVENS, H. P., HUNT, D. M., KING, I. A., BRYANT, S. P., EADY, R. A., LEIGH, I. M., ARNEMANN, J., MAGEE, A. I., KELSELL, D. P., e BUXTON, R. S. N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 971-976, 1999.

ROBLEDO, M. A., PRADA, S., JARAMILLO, D., e LEON, W. South American pemphigus foliaceus: study of an epidemic in El Bagre and Nechi, Colombia 1982 to 1986. **Br J Dermatol**, Oxford, v. 118, n. 6, p. 737-744, 1988.

ROCK, B., MARTINS, C. R., THEOFILOPOULOS, A. N., BALDERAS, R. S., ANHALT, G. J., LABIB, R. S., FUTAMURA, S., RIVITTI, E. A., e DIAZ, L. A. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **N Engl J Med**, Boston, v.320, n. 22, p. 1463-1469, 1989.

ROSMALLEN, J. G., LEENEN, P. J., PELEGRI, C., DREXHAGE, H. A., e HOMODELARCHE, F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v. 13, n. 5, p. 209-214, 2002.

ROSNER, B. Fundamentals of biostatistics, v. 2, p. 326-332, 1986.

ROSSI, R. E., MONASTEROLO, G., COCO, G., SILVESTRO, L., e OPERTI, D. Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. **Vaccine**, Amsterdam, v.25, n. 5, p. 957-964, 2007.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 22, p. 531-562, 2004.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**, New York, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.

SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S., SAKIHAMA, T., ITOH, M., KUNIYASU, Y., NOMURA, T., TODA, M., e TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 182, p. 18-32, 2001.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., e MANIATIS, T. **Molecular cloning-a laboratory manual**, v. 2^a, 1989.

SAMPAIO, S. A., RIVITTI, E. A., AOKI, V., e DIAZ, L. A. Brazilian pemphigus foliaceus, endemic pemphigus foliaceus, or fogo selvagem (wild fire). **Dermatol Clin**, Philadelphia, v.12, n.4, p. 765-776, 1994.

SHELLEKENS, G. A., DE JONG, B. A., VAN DEN HOOGEN, F. H., VAN DE PUTTE, L. B., e VAN VENROOIJ, W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **J Clin Invest**, Baltimore, v. 101, n. 1, p. 273-281, 1998.

SEKIGUCHI, M., FUTEI, Y., FUJII, Y., IWASAKI, T., NISHIKAWA, T., e AMAGAI, M. Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. **J Immunol**, Baltimore, v. 167, n. 9, p. 5439-5448, 2001.

SHLOMCHIK, M. J., COOKE, A., e WEIGERT, M. Autoimmunity: The genes and phenotypes of autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p. 738-740, 2004.

SITARU, C., MIHAI, S., e ZILLIKENS, D. The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. **Arch Dermatol Res**, Chicago, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2007.

STAHL, D., HOEMBERG, M., CASSENS, U., PACHMANN, U., e SIBROWSKI, W. Evidence that human autoimmune thrombocytopenia mediated by both immunoglobulin isotypes IgM and IgG is an independent disease entity. **Eur J Haematol**, Weinheim, v. 75, n. 4, p. 318-327, 2005a.

STAHL, D. e SIBROWSKI, W. Warm autoimmune hemolytic anemia is an IgM-IgG immune complex disease. **J Autoimmun**, Londres, v. 25, n. 4, p. 272-282, 2005b.

STANLEY, J. R., KLAUS-KOVTUN, V., e SAMPAIO, S. A. Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 87, n. 2, p. 197-201, 1986.

STEWART, J. M. e YOUNG, J. D. Solid Phase Peptide Synthesis, v. 2, 1984.

SUGIYAMA, H., MATSUE, H., NAGASAKA, A., NAKAMURA, Y., TSUKAMOTO, K., SHIBAGAKI, N., KAWAMURA, T., KITAMURA, R., ANDO, N., e SHIMADA, S. CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. **Dermatology**, Basel, v. 214, n. 3, p. 210-220, 2007.

TSUNODA, K., OTA, T., SUZUKI, H., OHYAMA, M., NAGAI, T., NISHIKAWA, T., AMAGAI, M., e KOYASU, S. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 32, n. 3, p. 627-633, 2002.

TUR, E. e BRENNER, S. Contributing exogenous factors in pemphigus. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v. 36, n. 12, p. 888-893, 1997.

TUR, E. e BRENNER, S. Diet and pemphigus. In pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. **Arch Dermatol**, Chigaco, v. 134, n. 11, p. 1406-1410, 1998.

VAUX, D. L. e FLAVELL, R. A. Apoptosis genes and autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 719-724, 2000.

VELDMAN, C., HOHNE, A., DIECKMANN, D., SCHULER, G., e HERTL, M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. **J Immunol**, Baltimore, v. 172, n. 10, p. 6468-6475, 2004a.

VELDMAN, C., PAHL, A., BEISSERT, S., HANSEN, W., BUER, J., DIECKMANN, D., SCHULER, G., e HERTL, M. Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. **J Immunol**, Baltimore, v. 176, n. 5, p. 3215-3222, 2006.

VELDMAN, C., STAUBER, A., WASSMUTH, R., UTER, W., SCHULER, G., e HERTL, M. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. **J Immunol**, Baltimore, v. 170, n. 1, p. 635-642, 2003.

VELDMAN, C. M., GEBHARD, K. L., UTER, W., WASSMUTH, R., GROTZINGER, J., SCHULTZ, E., e HERTL, M. T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. **J Immunol**, Baltimore, v. 172, n. 6, p. 3883-3892, 2004b.

WANG, Y., AMAGAI, M., MINOSHIMA, S., SAKAI, K., GREEN, K. J., NISHIKAWA, T., e SHIMIZU, N. The human genes for desmogleins (DSG1 and DSG3) are located in a small region on chromosome 18q12. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 3, p. 492-495, 1994.

WARREN, S. J., ARTEAGA, L. A., RIVITTI, E. A., AOKI, V., HANS-FILHO, G., QAQISH, B. F., LIN, M. S., GIUDICE, G. J., e DIAZ, L. A. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 120, n. 1, p. 104-108, 2003.

WARREN, S. J., LIN, M. S., GIUDICE, G. J., HOFFMANN, R. G., HANS-FILHO, G., AOKI, V., RIVITTI, E. A., SANTOS, V., e DIAZ, L. A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **N Engl J Med**, Boston, v. 343, n. 1, p. 23-30, 2000a.

WARREN, S. J., LIN, M. S., GIUDICE, G. J., HOFFMANN, R. G., HANS-FILHO, G., AOKI, V., RIVITTI, E. A., SANTOS, V., e DIAZ, L. A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **N Engl J Med**, Boston, v. 343, n. 1, p. 23-30, 2000b.

WERWITZKE, S., TRICK, D., KAMINO, K., MATTHIAS, T., KNIESCH, K., SCHLEGELBERGER, B., SCHMIDT, R. E., e WITTE, T. Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 52, n. 11, p. 3629-3638, 2005.

WUCHERPFENNIG, K. W. Structural basis of molecular mimicry. **J Autoimmun**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 293-302, 2001.

WUCHERPFENNIG, K. W., YU, B., BHOL, K., MONOS, D. S., ARGYRIS, E., KARR, R. W., AHMED, A. R., e STROMINGER, J. L. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 92, n. 25, p. 11935-11939, 1995a.

WUCHERPFENNIG, K. W., YU, B., BHOL, K., MONOS, D. S., ARGYRIS, E., KARR, R. W., AHMED, A. R., e STROMINGER, J. L. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 92, n. 25, p. 11935-11939, 1995b.

YAMASHINA, Y., MIYAGAWA, S., KAWATSU, T., IIDA, T., HIGASHIMINE, I., SHIRAI, T., e KANESHIGE, T. Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 52, n. 1, p. 74-77, 1998.

YOLES, E., HAUBEN, E., PALGI, O., AGRANOV, E., GOTHILF, A., COHEN, A., KUCHROO, V., COHEN, I. R., WEINER, H., e SCHWARTZ, M. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. **J Neurosci**, Washington, v. 21, n. 11, p. 3740-3748, 2001.

ZEOTI, D. M., FIGUEIREDO, J. F., CHIOSSI, M. P., e ROSELINO, A. M. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v.33, n. 9, p. 1065-1068, 2000.

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

“ASPECTOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO”

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa ASPECTOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

- **OBJETIVO DO ESTUDO**

O objetivo desse estudo é conhecer porque certas pessoas contraem o fogo selvagem (pênfigo foliáceo endêmico) enquanto outras aparentemente são resistentes ao desenvolvimento dessa doença. A predisposição ao fogo selvagem depende de vários fatores. Alguns desses fatores são do ambiente no qual a pessoa vive e de seus hábitos alimentares ou medicamentos. Outros são genéticos, hereditários. Entretanto, os fatores de predisposição ainda são pouco conhecidos. Esse trabalho de pesquisa científica vai esclarecer quais são os genes diferencialmente expressos e também quais as interações celulares envolvidas na patogênese da doença. Esse estudo permite identificar fatores que tornam a pessoa mais, ou menos, predisposta à doença. O resultado poderá auxiliar para a prevenção, tratamento e cura da doença, no futuro.

- **PROCEDIMENTOS**

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (cerca de 50 ml, ou seja, correspondente ao volume de um copo de cafezinho) e uma amostra da pele, do mesmo tipo que é colhida para os exames de laboratório solicitados pelo seu médico. Essa amostra de pele (biópsia) será obtida pelos médicos responsáveis. Você também irá responder a algumas perguntas sobre a sua origem e a origem de seus ancestrais, assim como sobre os seus hábitos e condições de vida.

- **RISCOS**

Não há riscos previstos na execução do estudo, sendo que os únicos desconfortos poderão ser a coleta da amostra de sangue e da biópsia de pele.

- **BENEFÍCIOS**

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você. Porém, o conhecimento adquirido através deste estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da doença. Isso poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de prevenção e tratamento, com menos efeitos indesejados.

- **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado médico para justificar a sua falta.

- **ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS**

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

- **GARANTIA DE SIGILO E PRIVACIDADE**

A sua identificação será mantida confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

- **EQUIPE DE PESQUISADORES**

Os pesquisadores envolvidos nesse projeto são:

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, Departamento de Genética, UFPR

Colaboradores: Dra. Ana Maria Roselino – FMRP-USP; Biólogas Karen Francine Köhler e Danielle Malheiros Ferreira, Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Genética, UFPR.

Número de telefone: (+41) 3361-1746 e 3361-1724

Diante do exposto acima eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que poderão dele resultar. Concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja, os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

_____, _____ de _____ de _____
local data

Assinaturas

Voluntário
RG

Pesquisador
RG

ANEXO 2 – FICHA DE AVERIGUAÇÃO

PROJETO PÊNFIGO FOLIÁCEO

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	Nº DO PRONTUÁRIO	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

1) IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)

(2) casado(a) (5) Outros: _____

(3) viúvo(a)

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Município: _____ UF: ____

Endereço: _____

Telefone: (____) _____

Município: _____ UF: ____ Próximo a: _____

Nome, telefone e endereço de pessoa para contato:

Municípios onde residiu:

MUNICÍPIO	TEMPO DE RESIDÊNCIA	EXPOSIÇÃO A (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	OBS

Código:

(1) Animais, (2) Insetos, (3) Rios, (4) Lavouras

Grupo étnico:

Pesquisador		Autoclassificação	
Lab	IBGE	Lab	IBGE
(1) Branco	(1) Branca	(1) Branco	(1) Branca
(2) Mulato-claro	(2) Preta	(2) Mulato-claro	(2) Preta
(3) Mulato-médio	(3) Amarela	(3) Mulato-médio	(3) Amarela
(4) Mulato-escuro	(4) Parda	(4) Mulato-escuro	(4) Parda
(5) Negro	(5) Indígena	(5) Negro	(5) Indígena
(6) Indígena		(6) Indígena	
(7) Oriental		(7) Oriental	
(8) Branco brasileiro		(8) Branco brasileiro	

Escolaridade: _____ anos completos de estudo

Grau de instrução: (1) Analfabeto (5) Médio completo
 (2) Fundamental incompleto (6) Superior incompleto
 (3) Fundamental completo (7) Superior completo
 (4) Médio incompleto (8) Pós-graduação

História ocupacional

Emprego/Ocupação	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)	OBS

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: _____

Nº de cômodos: _____

Nº banheiros: _____

Saneamento básico: (1) Sim (2) Não

Energia elétrica: (1) Sim (2) Não

Nº de pessoas que vivem na habitação: _____

2) HISTÓRIA FAMILIAR

Nome do pai: _____

Município de nascimento : _____ UF: _____

Ascendência do pai:

(1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe (incluir sobrenome solteira): _____

Município de nascimento : _____ UF: _____

Ascendência da mãe:

(1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? _____

Quantos filhos nasceram vivos? _____

Quantos filhos nasceram mortos? _____

Algum aborto (perca)? _____

Pais consangüíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)

Número de irmãos - total: _____

Número de irmãos vivos: _____

Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não

Ordem de nascimento dos irmãos:

Alguém na família tem a mesma doença? (1) Sim (2) Não

Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)

A doença foi semelhante à sua? (1) Sim (2) Não

Caso não seja semelhante, especificar abaixo a diferença:

Outras doenças na família:

3) ASPECTOS CLÍNICOS

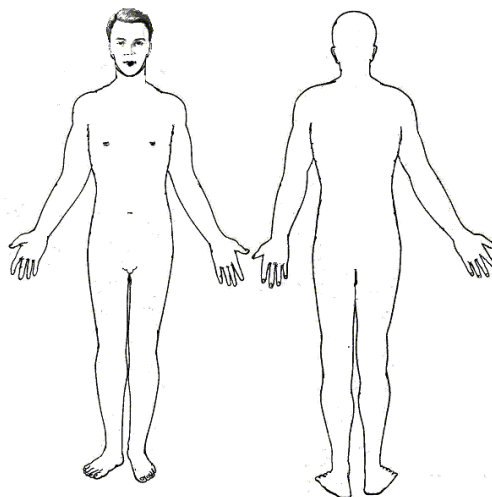
LESÃO PRIMÁRIA

Município em que apareceu: _____ Idade: _____

Ano: _____

Mês do ano em que apareceu: _____

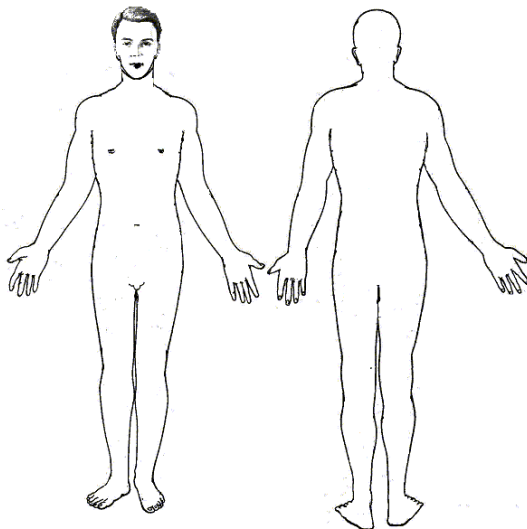
Região do corpo:



EVOLUÇÃO DAS LESÕES

A lesão se disseminou? (1) Sim (2) Não

Caso tenha se disseminado, utilize o esquema abaixo para mostrar a evolução em ordem crescente (ex: 1 marca o primeiro lugar em que surgiram novas lesões, 2 o segundo e assim sucessivamente. Utilizar a mesma chave numérica na tabela abaixo.



[LOCAL (usar número colocado no esquema acima)]	TEMPO APÓS LESÃO PRIMÁRIA

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Base do diagnóstico: (1) Informações clínicas (2) Histopatológico (3) Imunohistoquímica

Local do diagnóstico:

Instituição: _____ Município: _____ UF: _____

Informações adicionais sobre diagnóstico:

(1) Informações clínicas: _____

(2) Histopatológico: _____

(3) Imunohistoquímica: _____

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

ANTICORPO	DATA	TÍTULO

TRATAMENTO ATUAL

Medicamento : _____ Dose: _____ Posologia: _____

Data de início: _____

Melhora das lesões: (1) Sim (2) Não

TRATAMENTOS ANTERIORES

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

Houve interrupção do tratamento? (1) Sim (2) Não

Se houve interrupção, especificar:

Tempo: _____ (meses)

Motivo: _____

OUTROS MEDICAMENTOS

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

OUTRAS DOENÇAS:

DOENÇA	DATA DE DIAGNÓSTICO	DATA DE CURA	TRATAMENTO

HÁBITOS ALIMENTARES

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Frequência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			
(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

AGENTE	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)	Frequência (vezes por semana)	OBS

ANEXO 3 – LISTA DE MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1) MEIOS DE CULTURA:

DMEM completo 1 (Dulbecco Modified Eagle Medium) adicionado de:

L-glutamina	2mM
Hepes	10mM
Piruvato de sódio	1%
SHNi (pool de soro humano normal inativado)	10%

RPMI 1640 completo adicionado de:

L-glutamina	2mM
Hepes	10mM
Piruvato de sódio	1%
SFBi (soro fetal bovino inativado)	10%

NOTA: Todos os meios de cultura foram acrescidos dos antibióticos Gentamicina (40 µg/ml) e Peflacin (20 µg/ml).

Solução de congelamento

SFBi (soro fetal bovino inativado)	50%
RPMI completo	40%
DMSO (dimetil sulfóxido)	10%.

Corante vital – azul de Tripan

Água destilada adicionado de 1 % de azul de Tripan.

2) SOLUÇÕES:

Ficoll-Hypaque (d=1,077g/dl)

Ficoll 9 %	24 ml
Hypaque 60 %	10 ml

Preparou-se inicialmente uma solução de Ficoll e a seguir acrescentou-se o Hypaque, de acordo com a relação acima. A solução foi armazenada em frasco escuro à 4°C.

Tampão FACS

SBFi	2 %
Azida sódica.....	0,02 %
PBS.....	qsp.100 ml

Tampão de lise

TRIS (Trihidroxi-metil-aminometano) pH 7.5.....	50mM
NaCl (cloreto de sódio)	150mM
EDTA-etileno diamino tetracetato de sódio.....	1mM
Nonidet P-40	0,5%

Tampão de amostra (5x concentrado)

TRIS-base.....	0,375 g
SDS (dodecil sulfato de sódio).....	1,0 g
2-mercaptoetanol	2,5 ml
Glicerol.....	5,0ml
azul de bromofenol	0,05 g
água destilada.....	qsp 2,5 ml

Tampão de transferência

TRIS.....	25mM
glicina-ácido aminoacético	192 mM
metanol	20%
Água destilada	qsp 4 litros

Tampão bicarbonato-carbonato de sódio 0,05M pH= 9,6

NaHCO ₃ (bicarbonato de sódio)	1,465 g
Na ₂ CO ₃ (carbonato de sódio)	0,795 g
Água milli Q.....	500 ml

Tampão PBS (20 x concentrado)

NaCl.....	160 g
KCl	4 g
Na ₂ HPO ₄ anidro	23 g
KH ₂ PO ₄	4 g

Água destiladaqsp 1 litro

Tampão de lavagem (PBST)

PBS (20 x concentrado)50ml
 Tween 200,1%
 Água destiladaqsp 1 litro

Solução bloqueadora

Tampão PBS adicionado de:
 BSA (soro albumina bovina)2%

Solução diluente para o plasma e conjugado

PBS adicionado de:
 BSA.....1%

Solução de ácido cítrico 0,1 M

Ácido cítrico1,05 g
 Água destilada50ml

Solução fostato 0,2 M

Fosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4)1,42 g
 Água destilada50 ml

Tampão citrato Ph = 5,0

Solução de ácido cítrico0,1 M
 Solução fosfato0,2 M

Solução reveladora

OPD (orto-fenilenodiamina).....4,0 mg
 H_2O_2 30%.....4,0 ml
 Tampão citrato pH= 5,0.....10,0 ml

Solução bloqueadora

H_2SO_42 N

ANEXO 4 – CÓDIGO (ABREVIATURA) - NOME COMPLETO DOS AMINOÁCIDOS

A	(Ala)	- Alanina
C	(Cys)	- Cisteína
D	(Asp)	- Ácido aspártico
E	(Glu)	- Ácido glutâmico
F	(Phe)	- Fenilalanina
G	(Gly)	- Glicina
H	(His)	- Histidina
I	(Ile)	- Isoleucina
K	(Lys)	- Lisina
L	(Leu)	- Leucina
M	(Met)	- Metionina
N	(Asn)	- Asparagina
P	(Pro)	- Prolina
Q	(Gln)	- Glutamina
R	(Arg)	- Arginina
S	(Ser)	- Serina
T	(Thr)	- Treonina
V	(Val)	- Valina
W	(Trp)	- Triptofano
Y	(Tyr)	- Tirosina